

明 細 書

生体成分の組成が変化した溶液の調整方法

技術分野

- [0001] 本発明は生体成分含有溶液、特にヒトの血漿、尿等からタンパク質などの生体分子を分離して、生体成分の組成が変化した溶液の調製方法および調製装置に関する。特に、臨床プロテオーム解析を目的とし、微量成分の検出に対して妨害する成分、特に高分子量のタンパク質を除去し、生体成分の組成を変化させた溶液を調製する方法および装置に関する。

背景技術

- [0002] 近年、ポストゲノム研究として、プロテオーム解析研究(プロテオミクス)が注目され始めた。遺伝子産物であるタンパク質は遺伝子よりも疾患の病態に直接リンクしていると考えられることから、タンパク質を網羅的に調べるプロテオーム解析の研究成果は診断と治療に広く応用できると期待されている。しかも、ゲノム解析では発見できなかった病因タンパク質や疾患関連因子を多く発見できる可能性が高い。
- [0003] プロテオーム解析の急速に進展したのは、技術的には質量分析装置(mass spectrometer: MS)による高速構造分析が可能となってきたことが大きく、MALDI-TOF-MS(matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)等の実用化によって、ポリペプチドのハイスルースルー超微量分析が可能となり、従来検出し得なかった微量タンパク質までが同定可能となり、疾患関連因子の探索に強力なツールとなってきている。
- [0004] プロテオーム解析の臨床応用の第一目的は、疾患によって誘導あるいは消失するバイオマーカータンパク質の発見である。バイオマーカーは、病態に関連して挙動するため、診断のマーカーとなり得るほか、創薬ターゲットとなる可能性も高い。すなわち、プロテオーム解析の成果は、特定遺伝子よりも診断マーカーや創薬ターゲットとなる可能性が高いため、ポストゲノム時代の診断と治療の切り札技術となり、同定されたバイオマーカーは患者の薬剤応答性評価や副作用発現予測という直接的に患者が享受しえる利益につながることから、いわゆるテーラーメイド医療の推進に大きな

役割を果たすといえる。

- [0005] 臨床研究にプロテオーム解析を導入する場合には、大量の検体を迅速、確実に解析することが求められており、しかも臨床検体は微量で貴重なために高分解能・高感度・高機能測定を迅速に行う必要がある。この大きな推進力となったのは質量分析 (mass spectrometry) であり、質量分析装置のもつ超高感度でハイスループットの特性の貢献するところが大きい。しかしながら、その手法や機器が急速に改良されてきてはいるものの、プロテオーム解析が臨床現場で簡便かつ迅速に実施できる状況には、まだない。
- [0006] その原因のひとつに臨床検体の前処理が挙げられる。質量分析にかける前の処理として臨床検体のタンパク質を分画し精製することが必要で、この処理にはまだ数日かかるのが実態であり、さらに前処理の操作が煩雑で経験も必要とされることが、臨床への応用の大きな障害となっている。少量の血液や体液から全身の疾患の診断や病態管理ができれば、その有用性は極めて大きいですが、血漿中に含まれるタンパク質の多様性のために、多くの課題を生じている。
- [0007] ヒト・タンパク質は10万種以上とも推定されているが、血清中に含まれるタンパク質だけでも約1万種類にものぼるといわれ、総量としての血清中濃度は約60〜80mg/mLである。ヒト血清中の高含量のタンパク質は、アルブミン(分子量66kDa)、免疫グロブリン(150〜190kDa)、トランスフェリン(80kDa)、ハプトグロビン(>85kDa)、リポタンパク質(数100kDa)等であり、いずれも1mg/mLを超える程度に大量に存在する。一方、病態のバイオマーカーや病因関連因子と考えられているペプチドホルモン、インターロイキン、サイトカイン等の生理活性タンパク質の多くは、1ng/mL未満という極微量にしか存在せず。その含有量比は高分子の高含量成分に比べて、実にnanoからpicoレベルである。タンパク質の大きさという点では、タンパク質全種類の70%以下は分子量6万(60kDa)以下であり、上記の極微量なバイオマーカータンパク質はいずれもこの領域に含まれる場合がほとんどである(例えば非特許文献1)。これらのタンパク質は腎臓を通過して尿中に一部排泄されるため、血液のみならず尿を検体として測定することも可能である。
- [0008] 一般的な血清学的検査でプロテオーム解析するには、病因関連の微量成分検出

の妨害となる分子量6万以上の高分子成分を除外し、分子量1.5万未満のタンパク質をできるだけ回収することがまず必須となる。

- [0009] この高分子量タンパク質の分離・除去手段として、現状では高速液体クロマトグラフィー(liquid chromatography: LC) や二次元電気泳動(2 dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis: 2D-PAGE) が用いられているが、LCや2D-PAGEの作業だけでも1〜2日を要している。この所要時間は、MALDI-TOF-MSやESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) 等の数分という分析時間に比べて非常に長く、分析手段であるMSのもつハイスループットという大きな利点が臨床プロテオーム解析では十分発揮できずにいる。このため、医療現場で診断や治療のためにできるだけ短時間に分析結果がほしいという目的には、現時点では実用性に乏しいといわざるを得ず、日常の臨床検査にMSが利用しにくいひとつの大きな原因になっている。
- [0010] そこで、試料から一部または全部の高分子量タンパク質を除去する手段の高速化が達成されると、臨床プロテオーム解析による臨床検査の診断の迅速性は飛躍的に向上すると期待できる。具体的には、LCや2D-PAGEの代替となるような、微量の検体で高速に目的タンパク質群残すかたちで生体成分の組成が変化した生体成分含有溶液を得る方法や装置があればよい。
- [0011] アルブミンを主な対象物質として除去する手段として、すでに実用化されている製品あるいは開示されている技術としては、ブルー色素などのアフィニティーリガンドを固定化した担体(製品化されている。)、高分子量成分を遠心分離ろ過によって分画する遠心管形式の装置(製品化されている。)、電気泳動原理によって分画する方法、Cohnのエタノール沈澱などの伝統的な沈殿法やクロマトグラフィーによって分画する方法(例えば非特許文献2)などがある。
- [0012] しかしこれらは、いずれも分離性能が十分ではなかったり、微量試料には不適當であつたり、あるいは質量分析等に障害となる薬剤が混入したりするなどの問題点がある。特に、アルブミンをターゲットとして吸着だけで除外する方法は、アルブミンは除去できても免疫グロブリンなどの他の6万以上の高分子成分を除去する事は困難である。

- [0013] また、人工腎臓、人工肺、血漿分離装置などに使用されている分離膜はその用途に応じて様々な大きさのものが開発され、生体成分との適合性を向上させるような改善もされているが(特許文献2)、アルブミンなどの高分子量タンパク質を高効率にて取り除くという臨床プロテオームが抱えている課題の解決を示唆するものはない。
- [0014] これらを解決する方法や装置が開発できれば、医学研究ならびに臨床現場でプロテオーム解析が広く行われるようになり、より迅速で高精度な検査や診断が可能となって、有用な治療法がない難治性の疾患の原因究明や早期の診断法の開発には強力なツールとなると期待できる。
- [0015] 上述のとおり、臨床プロテオーム解析をする際に、妨害となる過剰な高分子量のタンパク質を除去することが必要である。2D-PAGEや液体クロマトグラフィーなどの高分離能ではあるが、煩雑で時間がかかる手法よりも、簡便で短時間に高い分離能を有するデバイスが求められている。
- [0016] 最近でも、Affi-Gel Blueゲルを用いた方法や(非特許文献3)“Gradiflow”システムを用いた方法(非特許文献4)などが有効な改良されたアルブミン除去法として発表されてはいるが、より多くの情報を得るための分析用溶液には至っていない。
- [0017] 血漿中からのアルブミンの除去を指標として、求められる手法の条件としては、血漿成分を高速で流せること、タンパク質変性作用がないこと、高機能化のための微細加工がされていること、著しく高価でないこと等である。これらの課題を解決する装置やデバイスは、まだ見当たっていない。
- 非特許文献1:アンダーソン・NL(Anderson NL),アンダーソン・NG(Anderson NG)著,「ザ・ヒューマン・プラズマ・プロテオーム:ヒストリー・キャラクター・アンド・ダイアグノスティック・プロスペクツ(The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects)」,モレキュラー・アンド・セルラー・プロテオミクス(Molecular & Cellular Proteomics), (米国), ザ・アメリカン・ソサエティー・フォー・バイオケミストリー・アンド・モレキュラー・バイオロジー・インコーポレーテッド(The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.),2002年, 第1巻, p845-867.
- 非特許文献2:日本生化学会編,「新生化学実験講座(第1巻)タンパク質(1)分離・精製・性質」,東京化学同人,1990年

非特許文献3:細胞工学別冊,「バイオ実験イラストレイテッド5」,秀潤社,2001年

非特許文献4:N. Ahmed et al., Proteomics, On-line版,2003年06月23日

非特許文献5:D. L. Rothmund ら. (2003), Proteomics, 第3巻, 279-287頁)

特許文献1:日本国、特表2002-542163号公報

特許文献2:日本国、特許3297707号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0018] 上記のような事情から、本発明が解決しようとする課題は、臨床プロテオーム解析をする際に妨害となる余分な高分子量のタンパク質を生体成分含有溶液から有利に分離・除去し、プロテオーム分析に好適な、生体成分の組成が変化した生体成分含有溶液を調製する方法および装置を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0019] 本発明のうち、第1の発明のグループとしては、以下の発明からなる。
1. 生体成分含有溶液を、少なくとも β 2-ミクログロブリンとアルブミンの透過比率が50以上である分離膜に供給し、分離膜により透過させることを特徴とする、総タンパク質に対するアルブミンの濃度組成比が0.3未満である生体成分の組成が変化した溶液の調製方法、
 2. 前記分離膜の透過比率が70以上であることを特徴とする前記の溶液の調製方法、
 3. 前記濃度組成比が0.1未満であることを特徴とする前記いずれかの溶液の調製方法、
 4. 生体成分含有溶液の総タンパク質中の β 2-ミクログロブリンの組成比率に対する、生体成分の組成が変化した溶液の総タンパク質中の β 2-ミクログロブリンの組成比率が、10倍以上であることを特徴とする前記いずれかの溶液の調製方法、
 5. 前記倍率が100倍以上であることを特徴とする前記の溶液の調製方法、
 6. 分離膜の膜内の流路が非対称構造である前記いずれかの溶液の調製方法、
 7. 生体成分が血液、血漿、血清などの血液由来物、尿、腹水、唾液、涙液、脳脊髄液、胸水もしくは細胞からタンパク質を抽出した溶液であることを特徴とする前記いず

れかの溶液の調製方法、

8. 前記いずれかの調整方法によって得られたプロテオーム解析用溶液、

9. 前記いずれかの方法によって生体成分の組成が変化した溶液を調製した後、前記溶液に含まれるタンパク質を分析することを特徴とする、生体成分に含まれるタンパク質の分析方法、

10. タンパク質の分析手段が質量分析、電気泳動分析および液体クロマトグラフィーから選ばれる少なくとも1種である請求項9記載のタンパク質の分析方法、

11. β 2-ミクログロブリンとアルブミンの透過比率が50以上である分離膜を内蔵するモジュールを有する装置であって、モジュールが分離膜の原液側に生体成分含有溶液の原液入口、および分離膜により透過した透過液の出口を少なくとも有することを特徴とする、生体成分の組成が変化したプロテオーム解析用の溶液を調製する装置。

[0020] また本発明のうち、第2の発明のグループとしては、以下の発明からなる。

1. 分離膜を内蔵し、前記分離膜の原液側流路に連結された原液入口および原液出口、ならびに分離膜の透過液の出口を有するモジュール、

前記原液入口と前記原液出口とを連結し、途中にポンプおよび分離用対象液入口を有する溶液循環回路、ならびに

前記分離用対象液入口の上流の位置に、または前記溶液循環回路の途中の位置に、設けられた希釈液流入口、

を具備することを特徴とする生体成分の組成が変化した溶液を調製するための液流回路、

2. 前記液流回路を少なくとも2個含み、1の液流回路の分離対象液出口と他の1の液流回路の分離対象液入口が液流路で直接または間接に連結されていることを特徴とする生体成分の組成が変化した溶液を調製するための装置、

3. 分離膜を内蔵するモジュールを用い、分離膜の原液側に生体成分含有溶液を流入させ、原液側の液をモジュールの外に設けられた溶液循環回路を通じて循環させ、分離膜を透過した液を生体成分の組成が変化した溶液として取り出す工程であって、生体成分含有溶液の流入開始後、生体成分含有溶液への希釈液を、モジュー

ルに内蔵した分離膜の原液側に追加流入させることを特徴とする、生体成分の組成が変化した溶液の調製方法、

4. 分離膜の原液側に流入する生体成分含有溶液の流量 Q_1 、透過した液の流量 Q_2 が、 $0 < Q_2 / Q_1 < 1$ を満たす条件で分離されることを特徴とする前記の溶液の調製方法、

5. Q_2 / Q_1 が、 $0.005 \leq Q_2 / Q_1 \leq 0.5$ である前記の溶液の調製方法、

6. 透過した液の流量 Q_2 と分離膜の原液側に流入する生体成分含有溶液および希釈液の流量の和 Q_3 が $0.5 \leq Q_2 / Q_3 \leq 1.5$ を満たすものである前記いずれかに記載の溶液の調整方法、

7. Q_2 / Q_3 がおよそ1である前記の溶液の調製方法、

8. 希釈液に、生理食塩水または緩衝溶液を用いることを特徴とする請求項前記いずれかの載の溶液の調整方法、

9. 生体成分が血液、血清などの血液由来物、尿、腹水、唾液、涙液、脳脊髄液、胸水もしくは細胞からタンパク質を抽出した溶液であることを特徴とする前記いずれかの溶液の調製方法、

10. 2個のモジュールを用い、第1のモジュールで前記いずれかの調製方法で得られた溶液を用い、さらに第2のモジュールで前記いずれかの調製方法を行うことを特徴とする生体成分の組成が変化した溶液の調製方法。

[0021] さらに、本発明のうち、第3の発明のグループとしては、以下の発明からなる。

1. 生体成分含有溶液を少なくとも2工程の処理を行うことによって、生体成分含有溶液から生体成分の組成が変化した溶液を調製する方法であって、前記工程が

(1)分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を吸着する工程、

(2)分子量がアルブミン以上のタンパク質を分子篩いにより分画し、一部または全部を除去する工程および

(3)タンパク質を濃縮する工程

から選ばれる少なくとも2工程を連結して用いることを特徴する生体成分から組成が変化した溶液を調製する方法、

2. 前記(1)の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスル

ホン、ポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレンおよびポリプロピレン、からなる群より1種類以上選択される素材を含む材料を用いることを特徴とする前記の溶液の調製方法、

3. 前記(2)の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリエチレンおよびポリプロピレンからなる群より1種類以上選択される素材を含む分離膜を用いることを特徴とする前記いずれかに記載の溶液の調製方法、

4. 前記(3)の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンおよびポリプロピレンからなる群より1種類以上選択される素材を含む分離膜を用いることを特徴とする前記いずれかに記載の溶液の調製方法、

5. ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2価金属イオンおよびアルキル基含有化合物からなる群より1種類以上選択される物質が表面に固定された素材を(1)の工程または(2)の工程に用いる前記いずれかに記載溶液の調製方法、

6. 界面活性剤、乳化剤、有機溶媒、アルコール、エチレングルコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、硫酸プロタミン、硫酸アンモニウム、ポリフェノール、ブルー色素、カオトロピック塩およびアルキル基含有化合物からなる群より1種類以上選択される物質を(1)の工程または(2)の工程における水溶液に添加することを特徴とする前記いずれかに記載の溶液の調製方法、

7. 生体成分含有溶液がヒト由来成分の検体を含むことを特徴とする前記いずれかに記載の溶液の調製方法、

8. (1)分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を吸着する手段、(2)分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を分子篩いにより分画する手段および(3)タンパク質を濃縮する手段から選ばれる少なくとも2種の手段を有し、

前記選ばれた手段同士が流路によって連結されていることを特徴とする生体成分含有溶液から組成が変化した溶液を調製する装置、

9. 液体クロマトグラフ、電気泳動装置または質量分析装置に連結できる液流出路を有する請求項29の溶液を調製する装置。

発明の効果

- [0022] これらの発明に開示された方法または装置により、血液、血清、血漿をはじめとする生体成分から、従来検出が困難であった微量のタンパク質を数多く検出できる溶液を、短期間で調製することが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0023] [図1]本発明の実施例1, 3で用いた分離システムの概略図である。(膜分離ユニットが1個)
- [図2]本発明の実施例2で用いた分離システムの概念図である。(膜分離ユニットが2個)
- [図3]本発明の実施例4で用いた分離システムの概略図である。(膜分離ユニットが3個)
- [図4]本発明の実施例5, 6で用いたシステムの概略図である。(膜分離機能と吸着機能とを有するユニットが3個、濃縮ユニットが1個の例)
- [図5]第3の発明のグループに属する装置の一例を示す概念図である。
- [図6]生体成分の組成が変化した溶液の電気泳動写真である。
- [図7]実施例2で得られた生体成分の組成が変化した溶液の2次元電気泳動写真である。
- [図8]ヒト血清溶液の2次元電気泳動写真である。

符号の説明

- [0024] 1 バルブ
- 2 溶液循環回路
- 3 循環用ポンプ
- 4 処理液回収口
- 5 第1工程モジュール

- 6 第2工程モジュール
 - 7 第3工程モジュール
 - 8 注入用ポンプ
 - 100 注入用ポンプ
 - 101 三方バルブ
 - 102 溶液循環回路
 - 103 循環用ポンプ
 - 104 膜分離ユニット処理液回収口
 - 105 分離膜モジュール
 - 106 モジュールの下部ポート
 - 202 2段目溶液循環回路
 - 203 2段目循環用ポンプ
 - 204 2段目の膜分離ユニットの処理液回収口
 - 205 第2分離膜モジュール
 - 206 2段目のモジュールの下部ポート
 - 302 3段目溶液循環回路
 - 303 3段目循環ポンプ
 - 304 3段目の膜分離ユニットの処理液回収口
 - 305 第3分離膜モジュール
 - 306 3段目のモジュールの下部ポート
 - 402 濃縮ユニット溶液循環回路
 - 403 濃縮ユニット循環ポンプ
 - 404 濃縮ユニットの濾液出口
 - 405 濃縮膜モジュール
 - 406 濃縮用モジュールの下部ポート
 - 407 濃縮ユニットの処理液回収口
- 発明を実施するための最良の形態

[0025] まず本発明に共通した部分について説明する。

[0026] 本発明でいう本発明で言う「生体成分の組成が変化した溶液」とは、血液などの生体由来の溶液すなわち生体成分含有溶液を原液として特定の処理を行いタンパク質の組成を変えた溶液のことである。ここで、「血液」とはヒトなどの動物血液のことであり、血清、血漿など血液中の一部の成分からなる溶液も含まれる。「生体由来の溶液」とは少なくとも血液の他、尿、唾液、涙液、脳脊髄液、腹水、胸水もしくは細胞からのタンパク質を抽出した溶液など生体関連の物質でタンパク質を含む溶液が例示される。

また本発明でいう「分離膜モジュール」とは、分離膜をハウジング内に収納してなるものである。このハウジングには、分離される溶液が流入する入口および流出する出口と、分離膜を透過して分離された溶液が流出する透過液流出口が備えられている。上記ハウジングの素材は特に限定しないが、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン等のプラスチック製のものを挙げることができる。

[0027] 本発明で得られる生体成分含有溶液の組成が変化した溶液は、タンパク質分析、特にプロテオーム解析に好ましく用いられるものである。分析法としては特に限定しないがLCや2D-PAGE、核磁気共鳴(NMR)、MALDI-TOF-MSやESI-MS等を例示することができる。これらは、アルブミン等の一部の溶液中に多量に存在するタンパク質が高い含有率で含まれていることによって、分析感度が低くなる分析方法であり、本発明で得られた溶液を用いることによって、高感度分析が可能となる。またMS、電気泳動を用いたプロテオーム解析に有用である。本発明の溶液調製装置が直接あるいは間接的に連結できるMSは特に限定されないが、好ましくは、電子スプレーイオン化型、大気圧イオン化型、四重極(QQQ)型、磁気セクター型、飛行時間型、MS/MS、MSn、FT-MS型、イオン捕捉型およびこれらの組合せ型のものである。また、MS/MSまたはMSn(例えばMS3)のようなタンデムMSを含む。タンデムMSの場合は、全てのタイプのMSが適用可能であるが、特にイオン捕捉、四重極-飛行時間(Q-TOF)、FT-MS、および四重極およびイオン捕捉とのセクター機器の組合せを使用することが効率がよい。これにより、MS/MSおよび/またはMSn測定において生じるピークの選択的な検出が可能となる。

- [0028] 本発明の方法または精製装置で得られた溶液を用いて、上記分析装置を使用することにより、さらに発展されれば各種微量タンパク質成分の構造情報を集めることができる。それらはペプチド・マスフィンガープリント(peptide-mass fingerprint: PMF)のみならず、各ペプチドの一次構造情報(アミノ酸配列)も含まれる。
- [0029] 次に第1の発明のグループについて説明する。
- [0030] 第1の発明のグループで生体成分の組成が変化し、特定されるアルブミンの濃度組成比が0.3未満である溶液を得るためには、生体成分含有溶液を β 2-ミクログロブリンのふるい係数をアルブミンのふるい係数で除した値である透過比率が50以上である分離膜に供給し、分離膜を透過した液を採取する方法が採用される。またその方法のためには、 β 2-ミクログロブリンとアルブミンの透過比率が50以上である分離膜を内蔵するモジュールを有し、モジュールが分離膜の原液側に生体成分含有溶液の原液入口、および分離膜により透過された透過液の出口を少なくとも有する装置が使用される。前記装置のモジュールにおいては、分離膜の原液側に生体成分含有溶液の原液出口を有することもできる。
- [0031] 前記分離膜の透過比率は70以上であることが好ましく、更には140以上であることが好ましい、上限値は特に設けないが、この値があまりにも高い膜分離ユニットでは、所望の分子量1.5万未満のタンパク質を回収する量が少なくなってしまうことが懸念されるため、好ましくは10000以下である方がよい。この分離膜には中空糸膜を用いることが好ましい。中空糸膜はタンパク質を透過する目的では、従来より人工腎臓と言われる透析モジュールの素材として多く利用されている。人工腎臓に使用される分離膜は、アルブミン等のタンパク質をなるべく透過させないようにし、クレアチニンや尿素などの低分子成分を透過させるよう設計されており、中空糸内腔側に血液を流し、中空糸外腔から、生体にとって不要な低分子のタンパク質を流出させることにより血液を浄化している。第1の発明のグループの分離膜において、中空糸膜を通じて中空糸内腔側から外側に透過していく手法が好ましい。特に、中空糸内腔側にはアルブミン等の高分子量成分をなるべく透過せず、一方、主に分子量1.5万以下のタンパク質成分を透過させることにより、溶液を得る方法が好ましい。平膜の分離膜を用いても同様の結果を得ることは可能であるが、中空糸膜の利用は処理液量あたり

の表面積が大きくなる事が容易であること、また操作上の圧力損失が少ないため、効率よく本発明を実施することができる。

[0032] 第1の発明のグループで用いる分離膜の素材は特に限定しないが、セルロース、セルローストリアセテート等のセルロース系ポリマー、ポリカーボネート、ポリスルホンやポリエーテルスルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリエチレンおよびポリプロピレンからなる群より1種類以上選択される高分子を含む素材が使用される。この中でも近年透析器などに良く用いられているポリスルホンは分画特性が良好であるために好ましい素材である。膜構造に関しては、分離膜の膜内の流路が非対称構造であることが好ましく、さらには緻密層と、空隙率が高く膜強度を維持する支持層との多層構造からなる非対称構造であることが好ましい。この非対称構造は電子顕微鏡を用いて膜の断面構造を1000倍の観察条件にて観察した場合にて判断する。膜の厚み方向に対して空孔が十分確認できない層と空孔が確認できる層の両者が存在するか否かによって判断する。両者の層が確認される場合、非対称構造と認定する。

[0033] また、この非対称構造においては原液が接触する面の近傍が空孔が最も緻密であることが好ましい。なぜなら溶質による膜表面の目詰まりを低減できるからである。

[0034] 第1の発明のグループに使用される分離膜にはできるだけタンパク質が吸着しないことが好ましく、その観点から表面が親水性の膜が好ましい。特に親水性の膜はプロテオーム解析に重要な知見を与えるタンパク質の吸着を抑え、無駄なく回収する効果がある。親水性膜としては、親水化されていれば特に限定されないが、親水性の単量体と疎水性の単量体を共重合させたものや、親水性の高分子と疎水性の高分子をブレンド製膜したもの、あるいは疎水性の高分子からなる膜の表面に親水性ポリマーを結合、付着させたもの、疎水性の高分子からなる膜の表面を化学処理、プラズマ処理、放射線処理したものなどがあげられる。親水性成分を付与する化学構造としては特に限定しないが、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレンオキサイド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリアクリルアミドなどの親水性高分子が好ましい

さらに、必要に応じて上記の分離膜を用いての透過により得られる液から水分などの溶媒を取り除くというタンパク質を濃縮する工程をさらに行うことができる。

- [0035] 濃縮する工程では、平面フィルター、中空糸膜などの分離膜であって、分子篩い効果を有する多孔性膜を用い、分離ふるいによる濃縮を行う。サンプルが少量の場合には、既に市販されているような遠心分離器用のチューブに平面フィルターを貼り付けた濃縮デバイスを用い、一方大量のサンプルの場合には、中空糸を用いることが有効である。
- [0036] 濃縮工程で用いることのできる膜の素材は特に限定しないが、セルロース、セルローストリアセテート等のセルロースアセテート系ポリマー、ポリカーボネート、ポリスルホンやポリエーテルスルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリエチレンおよびポリプロピレンからなる群より1種類以上選ばれる高分子を含む素材が使用される。この中でも近年透析器などに良く用いられているポリスルホンは分画特性と高い透水性を有する膜を得ることができるために好ましい素材である。
- [0037] 濃縮工程に使用される膜の構造に関しては、均一構造に近いスポンジ構造を有するものや、緻密層と空隙率が高く膜強度を維持する支持層の多層構造からなる非対称膜のいずれも用いることができる。濃縮工程に使用される膜の分子分画性能に関しては、生理的食塩水中でペプチドを通過させない程度の分子分画能、例えばカットオフ値が0.5kDa以下、好ましくは0.1kDa以下の性能を有する膜か限外ろ過膜を用いることが好ましい。
- [0038] 第1の発明のグループの調製の目的とする生体成分の組成が変化した溶液では、分子量1.5万未満のタンパク質の存在割合が高いことが必要であり、本発明では前記存在割合の指標として、分子量1.16万である β 2-ミクログロブリンを用いている。また、アルブミンや免疫グロブリン、トランスフェリンなどの高分子量のタンパク質が少ないことも必要であり、ここでは分子量が6万に近いアルブミンを指標にした。アルブミンを指標とする理由は、血液の場合はアルブミンの量が最も多いことと、膜を使用した方法の場合にアルブミンが十分に取り除かれていれば、通常は免疫グロブリンなどの

より大きな分子も同時に取り除くことができるからである。

[0039] また、得られた生体成分の組成が変化した溶液を用いて、良好なプロテオーム解析を行うためには、生体成分含有溶液の総タンパク質中の β 2-ミクログロブリンの組成に対する生体成分の組成が変化した溶液の総タンパク質中の β 2-ミクログロブリンの組成組成が10倍以上であることが好ましく更には100倍以上、特に好ましくは1000倍以上であることが好ましい。これは、質量分析装置などにおいては装置に注入できるタンパク質量が限られているため、測定感度を上げることができるからである。

[0040] このようにして総タンパク質中の分子量6万以上のタンパク質の組成比率が低い液を得ることができるが、高感度の分析を行うためにはタンパク質中のアルブミンの組成比が0.3未満であることが望ましく、さらには0.1未満、またさらには0.01未満であることがよい。

[0041] 以下、第1の発明のグループの一態様例につき、図を用いながら説明する。

[0042] 図1は、第1の発明の溶液を調製する装置の例を示した概念図である。液の流れを矢印で示してある。血清など生体成分である検体またはそれを含む生体成分含有溶液は、注入用ポンプ100から、三方バルブ101を通じて、第1工程の特定の透過比率を有する分離膜を内蔵する第1分離膜モジュール105に注入され、チューブからなる溶液循環回路102の中を循環用ポンプ103によって送液せられ、循環する。第1工程で分離膜を透過した透過液は、透過液の出口である1段目の膜ユニット処理液回収口104から得られる。この態様が1工程の基本単位(ユニット)である。これにより所望のプロテオーム解析用の液が得られる。さらに高分子量のタンパク質を除去したい場合には、複数のモジュールを連結することができる。図2は2本のモジュールを連結して2段処理を行う例を示しており、図3は3本のモジュールを連結して3段処理を行う例を示している。透過した液は、透過液出口である膜分離ユニットの処理液回収口に直結されたチューブによって次工程のユニットに注入される。目的とする溶液は工程の最下流のユニットに存在する回収口(図1の装置においては104、図2の装置においては204、図3の装置においては304)から得られる。

[0043] 図4は図3の装置にさらに濃縮の機能を有するモジュールを連結した装置であり、目的とする溶液は濃縮ユニットの処理液回収口407から回収される。

[0044] 次に第2の発明のグループについて説明する。

[0045] 第2の発明のグループのうち、生体成分の組成が変化した溶液の調整方法としては、分離膜を内蔵するモジュールを用い、分離膜の原液側に生体成分含有溶液を流入させ、原液側の液をモジュールの外に設けられた溶液循環回路を通じて循環させ、分離膜を透過した溶液を取り出す工程であって、生体成分含有溶液の流入後、生体成分含有溶液に対する希釈液をモジュールに内蔵した分離膜の原液側に追加流入させることを特徴とするものである。また第2の発明のグループのうち、生体成分の組成が変化した溶液の調整手段としては、分離膜を内蔵し、前記分離膜の原液側流路に連結された原液入口および原液出口、ならびに分離膜の透過液の出口を有するモジュール、前記原液入口と前記原液出口とを連結し、途中にポンプおよび分離用対象液入口を有する溶液循環回路、ならびに前記分離用対象液入口の上流の位置に、または前記溶液循環回路の途中の位置に、設けられた希釈液流入口を具備することを特徴とする。

[0046] 第2の発明においても分離膜とは多孔性の分離膜のことであり、平面フィルター、カートリッジ式フィルター等の平膜型分離膜、中空糸膜等の中空状分離膜のいずれも用いることができる。特に、中空糸膜は処理液量あたりの膜表面積が大きく、圧損も少なくできるため、効率よく用いることができる。処理液量あたりの膜表面積を大きくするためには、中空糸膜の内径は小さい方が好ましく、1000 μ m以下が好ましく、500 μ m以下がより好ましい。また、平面フィルターは製膜が容易で安価に作成することができるという利点がある。膜素材としては、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリエチレンおよびポリプロピレンおよびこれらの誘導体からなる群より1種類以上選択される素材を例示することができる。この中でも近年透析器などに良く用いられているポリスルホンは分画特性が良好であるために好ましい素材である。

[0047] 第2の発明のグループで使用される分離膜では、分子量1.5万未満のタンパク質と分子量6万以上のタンパク質との透過比率が50以上である分離膜を用いることが好ましい。その他の好ましい特性、形状は第1の発明のグループの分離膜について

述べたものと同様である。

- [0048] 第2の発明のグループのうち溶液の調整に関する発明においては、分離膜の原液側に、生体成分含有溶液を流入させ、その後に生体成分含有溶液に対する希釈液を流入させる。希釈液を追加すると、膜の表面での過剰な濃縮が防止され、分離膜の透過比率の悪化が防止されるからである。また、希釈液には生理食塩水または「緩衝溶液」を用いることが好ましい。「緩衝溶液」としては、MES、BIS-TRIS、ADA、ACES、PIPES、MOPSO、BIS-TRIS PROPANE、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、MOBS、TAPSO、TRIZMA、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、TRICINE、GLY-GLY、BICINE、PBS、TAPS、AMPD、TABS、AMPSO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS、CABS等を挙げることができる。上記緩衝溶液は略称で示してあるが、詳細な内容は和光純薬工業(株)、シグマアルドリッチジャパン(株)などの試薬メーカーのカタログやMSDS(安全性データシート)を参照すれば理解できる。
- [0049] モジュールに流入する生体成分含有溶液の流量 Q_1 とはモジュールに流入し回路を流れる液の流量のことであり、分離された液が送液される流量 Q_2 よりも大きいことが望ましい。なぜなら分離膜表面での濃縮防止、膜表面への堆積物の積層防止、膜孔の目詰まり防止の観点からである。さらに分離膜モジュールに流入する液の流量 Q_1 、分離された液が送液される流量 Q_2 の比率 Q_2/Q_1 は、0.5以下であることが望ましい。また、分離膜モジュールに流入する液の流量 Q_1 、分離された液が送液される流量 Q_2 の比率 Q_2/Q_1 が0の場合は、濾過が行われず、拡散のみでの物質移動になるため、分離の速度が遅くなるため、0.005以上であることが望ましい。
- [0050] 分離膜で透過していく流量 Q_2 と、モジュールに流入される希釈液の流量 Q_3 とは $0.5 \leq Q_2/Q_3 \leq 1.5$ の関係にあることが望ましく、さらに Q_2/Q_3 が0.9-1.1、すなわちおよそ1であることが好ましい。
- [0051] さらに、2個のモジュールを準備し、第1のモジュールにおいて、上述のように希釈液を追加流入させつつ、生体成分の組成が変化した溶液を得た後、当該溶液を第2のモジュールに流入させ、さらに希釈液を追加流入させつつ、さらに生体成分の組成が変化した溶液を調整すれば、プロテオーム解析にさらに好適な高分子量のタン

パク質が除去された溶液を調整することができる。さらに、第3、第4など追加のモジュールを準備し、同様の工程を行うこともできる。

- [0052] また必要に応じて上述の1個のモジュールを用いた工程または複数のモジュールを用いた工程から得られる液から、水分などの溶媒を取り除きタンパク質を濃縮する工程をさらに行うことにより、生体成分の組成が変化した溶液を得ることができる。その濃縮の工程に使用される膜の素材、構造、性能については、第1の発明のグループの説明において、濃縮工程について説明した内容と同様である。
- [0053] 次に第3の発明のグループについて説明する。
- [0054] 第3の発明によれば、吸着、篩いによる分画、および濃縮の3つのタンパク質を処理する工程のうち少なくとも2工程を有することによって、目的とするタンパク質成分を多く含有する溶液を効率的に調製することができる。
- [0055] 第3の発明のグループのうち溶液の調整方法に関する発明では、(1)分子量がアルブミン以上のタンパク質を吸着する工程、(2)分子量がアルブミン以上のタンパク質を分子篩いにより分画し、一部または全部を除去する工程および(3)タンパク質を濃縮する工程から選ばれる少なくとも2工程を有することが特徴である。
- [0056] また、第3の発明のグループにおける生体成分含有溶液から組成が変化した溶液を調製する装置としては、(1)分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を吸着する手段、(2)分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を分子篩いにより分画する手段および(3)タンパク質を濃縮する手段から選ばれる少なくとも2種の手段を有し、前記選ばれた手段同士が流路によって連結されていることを特徴とする。前記装置においては、液体クロマトグラフ、電気泳動装置または質量分析装置に連結できる溶液の流出路を有するものであることが、タンパク質分析の簡便さから好ましい。
- [0057] 第3の発明のグループで分子量の基準となるアルブミンとはヒト、ウシ、その他哺乳動物および鳥類由来のアルブミンのことをいい、対象とする生体によって決定されるが、本発明では、ヒトのアルブミンを基準とするのが好ましい。分子量がアルブミン以上のタンパク質とは、主にアルブミン(分子量6〜7万)より高分子量のタンパク質のことをいう。アルブミンより高分子量であるか否かはSDS-PAGE(

sodiumdodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis:ドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動)という方法により判別可能である。

[0058] 以下第3の発明のグループで特徴づけられる3つの工程または手段について説明する。

(1) 分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を吸着する工程または手段

ここでいう「吸着」とは水溶液中に可溶化しているタンパク質が工程に存在する物質との相互作用により、その物質に捕捉されることをいう。

[0059] 本工程の吸着に用いられる素材は特に限定しないが、セルロース、セルローストリアセテート等のセルロース系ポリマー、ポリカーボネート、ポリスルホンやポリエーテルスルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンのいずれかひとつの素材の高分子が使用される。

[0060] また素材の形状としては、球状ビーズや繊維等の形態のもの、長繊維、短繊維などの繊維を素材とし、編物、織物、不織布などの布帛とした平面状の形態のもの、中空糸の形態のものなどが挙げられ、それぞれの形態において、表面の凹凸が大きい形状であることが吸着表面積を増大させる効果のために好ましい。また、平膜や中空糸膜等の透過型分離膜であれば、低分子のタンパクの分離も併せて行うことができるため、好ましい。

[0061] 基材自体の特性としては、目的とする溶液には必要であって除去されたくない低分子量タンパク質が吸着されないように、表面が親水性化されたものや、アルブミン等の高分子量タンパク質を選択的に吸着するために疎水性化されたものが、適宜選択されて使用される。

[0062] 親水性表面を有する基材としては、親水性の単量体と疎水性の単量体を共重合させたものや、親水性の高分子と疎水性の高分子を混合したもの、あるいは疎水性の高分子からなる表面に親水性ポリマーを結合、付着させたもの、疎水性の高分子からなる表面を化学処理、プラズマ処理、放射線処理したものなどがあげられる。親水

性成分として、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレンオキサイド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレートなどの親水性高分子の使用が好ましい。疎水性基材では、疎水性物質を使用したものや、疎水性リガンドを表面に導入したものが用いられる。疎水性成分としてはメタクリル酸エステル、アクリル酸エステル、エチレン、プロピレン等のオレフィン、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等の炭素-炭素二重結合を有する化合物からなる付加重合体や、ポリスルホン、セルロースなどの重合体を例示することができる。

- [0063] さらに、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2価金属イオン(Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} 等)、疎水性基(メチル基、ベンジル基、フェニル基、クロロメチル基、オクチル基、ラウリル基等)を有する化合物(例えばエタノール、イソプロピルアルコール、アミドメチル化ポリスチレン)などのうち、少なくともいずれかひとつ以上を固定化した素材を用いることもできる

(2) 分子量がアルブミン以上のタンパク質を分子篩いにより分画し、一部または全部を除去する工程

本工程では、平膜あるいは中空糸膜などの形態を有し、分子篩い効果を有する多孔性膜を用いるのが好ましい。特に中空糸膜を用いると分離膜の表面積が極めて大きくなるため、有効である。

- [0064] 本工程で好ましく用いられる膜の素材は特に限定しないが、セルロース、セルローストリアセテート等のセルロースアセテート系ポリマー、ポリカーボネート、ポリスルホンやポリエーテルスルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミドナイロン、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレンのいずれかひとつの素材の高分子が使用される。この中でも近年透析器などによく用いられているポリスルホンは、ふるい分けを行う異なる分子量の物質のうち、高分子量の物質に対する低分子量の物質のふるい係数の比が大きいという分画特性が良好であるために好ましい素材である。膜構造に関しては、均一構造に近いスポンジ構造を有するものや、緻密層と空隙率が高く膜強度を維持するために設けられた、厚みの厚い支持層と多層構造からなる非対称構造のものいずれも用いることができる。非対称構造の

認定方法、非対称構造の好ましい態様は第1の発明のグループにて説明した内容と同様である。

- [0065] 分画工程に使用される膜としては、膜表面の性質で表現すると親水性膜と疎水性膜とがある。
- [0066] 親水性膜では、親水性の単量体と疎水性の単量体を共重合させたものや、親水性の高分子と疎水性の高分子をブレンド製膜したもの、あるいは疎水性の高分子からなる膜の表面に親水性ポリマーを結合、付着させたもの、疎水性の高分子からなる膜の表面を化学処理、プラズマ処理、放射線処理したものなどがあげられる。親水性成分は特に限定しないが、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレンオキサイド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレートなどの親水性高分子が好ましい。これらの親水性膜は必要とするタンパク質の吸着を抑え、無駄なく回収する効果がある。
- [0067] 一方、疎水性膜では、膜素材として用いることができるものであれば特に限定されるものではないが、疎水性成分を混入したものや、疎水性リガンドを膜表面に導入したものが用いられる。疎水性成分としてはメタクリル酸エステル、アクリル酸エステル、エチレン、プロピレン等のオレフィン、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ポリ沸化ビニリデン等の炭素-炭素二重結合を有する付加重合性化合物からなる重合体や、ポリスルホン、セルロースなどの重合体を例示することができる。。
- [0068] さらに、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2価金属イオン(Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} 等)、疎水性基(メチル基、ベンジル基、フェニル基、クロロメチル基、オクチル基、ラウリル基等)を有する化合物(例えばエタノール、イソプロピルアルコール、アミドメチル化ポリスチレン)などのうち、少なくともいずれかひとつ以上を、付着または化学反応により固定化した素材を用いることもできる。
- [0069] 膜の分子分画性能に関しては、生理的食塩水中でアルブミンを通過させない程度の分子分画能、たとえばカットオフ値50kDa以下、さらに好ましくは30kDa以下のものが好ましく使用される。
- [0070] (1)の工程または(2)の工程では、投入する水溶液中に、各種の薬剤を加えて、吸着または分画性能を向上させることができる。具体的には、工程に用いる水溶液中に

、界面活性剤、乳化剤、有機溶媒、エチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、硫酸プロタミン、硫酸アンモニウム、ポリフェノール、ブルー色素、カオトロピック塩、疎水性基(メチル基、ベンジル基、フェニル基、クロロメチル基、オクチル基、ラウリル基等)を有する化合物(例えばエタノール、イソプロピルアルコール)などのうち、少なくとも1種以上を用いることができる。

- [0071] たえば、アルブミンの凝集を促進させる硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、カオトロピック塩等を適当量加えることにより、高分子成分のタンパク質を凝集させ巨大分子化を促進し、吸着の促進や分離膜からの漏出を抑制し、高分子成分の透過を効率的に抑制することができる。逆に、両性界面活性剤や陰イオン性海面活性剤等の界面活性剤を適当量加えることにより、タンパク質間の相互作用を抑制し、分子篩いによる分画を効率的に行うことができる。

(3)タンパク質を濃縮する工程

濃縮する工程とは溶液中のタンパク質を濃縮する工程を意味する。ここでいう濃縮工程では水溶液中から水が除去されるのはもちろん、分子量1kDa以下の低分子成分が除去されるものでもよい。本工程では、平面フィルターあるいは中空糸モジュールの膜に多孔性の膜を用い、分離ふるいによる濃縮を行う。分子分画能の点で、この工程で使用する膜は、上記(2)の分画工程に使用する分離膜とは異なる。さらに、上記(2)の分画工程で、分離膜を使用する場合は、膜を透過した液を所望の溶液とするが、(3)の濃縮の工程では、膜を透過せず残存した液が所望の液となることで異なる。

- [0072] 試料が少量の場合には、市販されている遠心分離器用のチューブに平面フィルターを貼り付けた濃縮デバイスを、大量のサンプルの場合には、中空糸を用いることが有効である。

- [0073] 濃縮工程で利用できる分離膜の素材は特に限定しないが、セルロース、セルローストリアセテート等のセルロース系ポリマー、ポリカーボネート、ポリスルホンやポリエーテルスルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリメチルメタクリレート等のポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンのい

ずれかひとつの素材の高分子が使用される。この中でも近年透析器などに良く用いられているポリスルホンは、分画特性が良好(すなわちふるい分けを行う異なる分子量の物質のうち、高分子量の物質に対する低分子量の物質のふるい係数の比が大き)であるために好ましい素材である。膜構造に関しては、均一構造に近いスポンジ構造を有するものや、緻密層と空隙率が高く膜強度を維持するために設けられた、厚みの厚い支持層との多層構造からなるも非対称構造のものいずれも用いることができる。非対称構造の認定方法、好ましい態様については、第1の発明のグループにて説明した内容と同様である。

[0074] 濃縮工程に使用される膜の分子分画性能に関しては、生理的食塩水中でペプチドを通過させない程度の分子分画能、すなわちカットオフ値が0.5kDa以下、さらに0.015kDa以下である分離膜か限外ろ過の分離膜が用いられる。

[0075] この第3の発明のグループにおいては、各工程の手段を溶液流路で連結し、連続して稼動できることによって、簡便かつ自動的に連続運転できるという効果が得られる。ただし各工程を独立して稼動させることもできる。送液には液流路に接続したポンプを用いることができるが、小規模の装置の場合にはシリンジによって送液してもよい。分離膜によらず遠心チューブ型装置によって濃縮する場合には、遠心操作で行っても構わない。

[0076] 第3のグループの発明の方法において、一つの工程ではあるが、(1)分子量がアルブミン以上のタンパク質を吸着する工程、(2)分子量がアルブミン以上のタンパク質を分子篩いにより分画し、一部または全部を除去する工程および(3)タンパク質を濃縮する工程から選ばれる2以上の機能を有する工程である場合には、その工程を2回以上行うことも方法に係る本発明の範囲に含まれる。第3のグループの発明の装置においても、一つの手段ではあるが、(1)分子量がアルブミン以上のタンパク質を吸着する手段、(2)分子量がアルブミン以上のタンパク質を分子篩いにより分画し、一部または全部を除去する手段および(3)タンパク質を濃縮する手段から選ばれる2以上の機能を有する手段である場合には、その手段を2以上連結することも装置にかかる本発明の範囲に含まれる。

[0077] 上記の(1)～(3)の工程は、さらに同一工程の繰り返しによって、さらに総タンパク

質量に対するアルブミンの比率が低減され、解析のターゲットとする低分子量のタンパク質の比率を高めるという優れた効果を得ることができる。同一工程の繰り返し、あるいは異なる2つの工程を用いることの判断は、最初に供給される生体成分に含まれるタンパク質の組成の程度によって設計することができる。

- [0078] 第3の発明のグループに示される調整方法により、健康成人の血漿の場合、その中のタンパク質組成にもよるが、この発明の1回の操作で、分子量50kDa以上の高分子量タンパク質の除去率90%以上、分子量50kDa未満のタンパク質の平均回収率70%以上、分子量50kDa未満のタンパク質の平均濃縮率10倍以上の効果が得られる。
- [0079] また、1回の処理時間が1〜6時間以内とすることができる。また別検体からのコンタミネーションおよびバイオハザードの防止の点から、一連のデバイスは一回使用とすることが好ましいが、本発明における方法に使用される装置はディスポーザブル仕様とすることができ、検体からの汚染の回避や分析の再現性の確保の点からも大きな利点である。
- [0080] 第3のグループの発明においても、この発明は生体成分含有水溶液生体成分含有溶液、特にヒトの血漿、尿、唾液、涙液、脳脊髄液、腹水、胸水等のからの生体分子特にタンパク質成分の分離に適する。上記の示した膜および中空糸モジュールのサイズならびに液の流速は、原料とする血漿や尿等の生体材料の質と量に依存して適宜決められるが、いわゆる卓上サイズで実施する場合、血漿では1〜400mL好ましくは5〜100mLで実施され、流速は1〜20mL/min好ましくは2〜10mL/minで行われる。
- [0081] 以下、第3の発明グループに属する生体成分含有水溶液生体成分含有溶液から組成を変化させる方法およびそのための装置の一態様例につき、図を用いながら説明する。
- [0082] 図5は、第3の発明のグループに属する装置の一例を示す概念図であり、吸着、分画、濃縮の順になる3工程の例である。液の流れを矢印で示してある。血清などの材料の検体、またはそれを含む生体成分含有水溶液生体成分含有溶液は、注入用ポンプ8、バルブ1を経て吸着、分画および濃縮のいずれかの機能を有する第1工程モ

ジュール5に注入され、チューブからなる溶液循環回路2の中をポンプ3によって送液せられ、循環する。第1工程で処理され得られた溶液は、処理液4から得られる。この態様が1工程という単位である。図5は3段の例を示しており、第2工程のモジュール6と第3工程のモジュール7が連結されている。得られた溶液は、処理液回収口に連結されたチューブによって次工程のモジュールに注入される。

[0083] 分子篩いによる分画の工程の場合には、工程の出口、すなわち処理液の回収口は、透過した溶液の出口となる、吸着工程の場合の工程の出口は、溶液循環回路の途中に設けられた出口となることが、通常であるが、吸着に透過型の膜を使用する場合には、透過した液の出口が、工程の出口となる。濃縮工程の場合の出口は溶液循環回路の途中に設けられた出口となる。図5の態様では、各循環用ポンプは各工程の下流に設けてあるが、この循環用ポンプが各工程の上流に設けるのでもよい。

[0084] 選ばれた工程のうち濃縮工程がもっとも下流にある場合には、各工程の処理が同時に行なうことが可能であり、従来別々に長時間かけて行った処理を短時間に行うことができる。

実施例

[0085] <透過比率の測定方法>

ヒト血清(SIGMA社 H1388もしくは同等品)を3000rpm15分の条件にて遠心処理を行い沈殿物を取り除いた後0.45 μ mのフィルター処理を行っておく。

[0086] 分離膜を内蔵する分離膜モジュールを準備し、原液(ヒト血清)側入口と原液側(ヒト血清)出口とをチューブにより接続することにより、溶液循環回路を構成しておく。溶液循環回路の途中には、原液側出口から原液側入口の方向に、サンプリングポート、循環させることなく溶液を廃棄することができる切り替えバルブ、溶液循環回路に溶液を流入させることができる流入路、原液を循環させるポンプ、サンプリングポートが順に設けられている。またモジュールの濾過側出口から、チューブを接続し、濾過を行うためのポンプ、濾過された液の出口(サンプリングポート)を順に設けておく。流入路を通じて、分離膜モジュールに対してPBS(日本製薬社製ダルベッコPBS(一))水溶液(以下、この水溶液を単に「PBS」という。)を充填しておく。原液側入口からヒト血清を原液を循環流量1ml/min、濾過流量0.2ml/minの流速で20℃にて濾

過を開始する。濾過中、モジュール出口の原液は、溶液循環回路の途中にある溶液を廃棄するためのバルブを切り替えることにより、戻さずに廃棄する。そのまま、ヒト血清注入開始から30分から60分後の間、モジュール原液入口近くのサンプリングポート、モジュール原液出口近くのサンプリングポートおよびモジュールの濾過側出口近傍のサンプリングポートそれぞれから試料を採取する。これら試料中のアルブミンおよび β 2-ミクログロブリンの濃度を測定し、これらの測定値からアルブミンおよび β 2-ミクログロブリンのふるい係数を算出する。この時原液側濃度はモジュール入口および出口近傍の各サンプリングポートから採取した試料の濃度の平均値を用いる。そして得られた β 2-ミクログロブリンのふるい係数をアルブミンのふるい係数で除した値を透過比率とする。なお、本実施例におけるアルブミン濃度の測定は、エスアールエル(株)に外注し、項目コード0721 4 (ラテックス凝集免疫法)にて測定した。この測定にて、アルブミン濃度0.4mg/L 以下の測定限界以下になったものについては、BETHYL 社製 Human Albumin ELISA Quantitation Kit (Cat No E80-129)にて測定した。 β 2-ミクログロブリン濃度の測定は、エスアールエル(株)に外注し、項目コード02103(ラテックス凝集免疫法)にて測定した

<2次元電気泳動によるタンパク質分析>

もとの生体成分含有溶液および本発明の方法で得られた「生体成分の組成が変化した溶液」を2次元電気泳動法によって分析した。方法は次の通りである。

1. 生体成分分離溶液に80%ショ糖溶液を等量加え、泳動用サンプルとする。
2. 市販の等電点電気泳動用ゲルであるIEF-PAGEmini pH3-10 1mm厚(TEFCO製)を泳動槽にセットする。
3. 上部バッファー(0.05M 水酸化ナトリウム)200mlと下部バッファー(0.01M リン酸)500mlを入れる。
4. 上部バッファーで各ウエルを洗浄し、10%ショ糖溶液を20ulをウエルにのせる。
5. ウエルに入れたショ糖溶液の下に1. で調整したサンプルをおく。
6. 泳動槽にカバーをし電源につなぎ、100Vで30分、200Vで30分、さらに500Vで60分泳動する。
7. ゲルカセットのプラスチック版をはがしゲルを取り出し、40%酢酸水溶液に浸け、

30分振とうする。

8. クマシーブリリアントブルー染色液(CBB染色)にて5分染色し、脱色液(10%メタノール、7.5%酢酸)にて脱色しバンドを確認し、水を換えながら30分以上水洗する。

9. ゲルを1レーン分切り出す。

10. 切り出したゲル片をSDS-PAGE用泳動バッファーに10-20分浸し平衡化させる。SDS-PAGE用泳動バッファー(以下泳動バッファーと記す)組成はトリス3.0g、グリシン14.4g、SDS1.0gに蒸留水を加えて1000mlとしたものである。

11. 市販のSDS-PAGE用ゲルであるSDS-PAGEmini 4-20% 1.5mm厚 2-Dwell(TEFCO製)を泳動槽にセットする。

12. 泳動バッファーを入れ、泳動バッファーでウエルを洗浄する。

13. 9. のゲル片を、2次元目のSDS-PAGEminiのウエルに気泡が入らないように注意しながら移す。小さいウエルには市販の分子量マーカであるレインボーマーカ(アマシヤム)を1ulのせる。

14. 1%アガロース/泳動バッファー(調整時にブロモフェノールブルーを目視で着色する程度に僅かに添加しておく)でゲルを封入する。

15. 泳動槽にカバーをし電源につなぎ、15mAで120分程度(ブロモフェノールブルーがゲルの下端まで移動するまで)泳動する。

16. ゲルカセットからゲルを取り出し、CBB染色、銀染色を行う。銀染色は、市販のキットである銀染色IIキットワコー(和光純薬社製)を使用する。

[0087] (実施例1)

ポリスルホン(ソルベ社製ユーデル(登録商標)P-3500)18重量部およびポリビニルピロリドン(BASF社製K30)9重量部をN, N'-ジメチルアセトアミド72重量部および水1重量部の混合溶媒に加え、90℃で14時間加熱して溶解し、製膜原液を得た。この製膜原液を外径0.3mm、内径0.2mmのオリフィス型二重円筒型口金の外側の管より吐出した。芯液としてN, N'-ジメチルアセトアミド58重量部および水42重量部からなる溶液を内側の管より吐出した。吐出された製膜原液は、口金から凝固浴液面までの距離350mmを通過した後、水100%の凝固浴に導かれ、中空糸膜

が得られた。得られた中空糸膜の構造を電子顕微鏡(日立社製S800)にて確認したところ非対称構造を有していた。得られた中空糸膜を10000本、一般の透析器と同様に透析液入口および透析液出口を有する円筒状のプラスチックケースに挿入し、両端部を樹脂で封止して、有効膜面積1.6m²の中空糸膜モジュールを作成した。この中空糸膜モジュールを水で洗浄した後、該モジュールに水が充填されている状態で γ 線を照射した。モジュールの γ 線吸収線量は27kGyであった。

- [0088] 該モジュールの中空糸膜を切り出し、100本を束ね、中空糸膜中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュールの外直径は約7mm、全体長さは約17cmであり、一般的な中空糸膜型透析器と同様の中空糸の外側のポートを2個有している。該ミニモジュールの中空糸膜およびモジュール内部を蒸留水にて洗浄した。
- [0089] その後、PBS(日水製薬社製ダルベッコPBS(-))水溶液を充填し、中空糸膜ミニモジュール(以降、ミニモジュール(1)と略す)を得た。本ミニモジュールを2本作成し、うち1本を用いて分離膜の透過比率を測定したところ70.5であった。残りの1本は以下の実験に用いた。
- [0090] ヒト血清(SIGMA社 H1388、Lot 28H8550)を3000rpm15分の条件にて遠心処理を行い沈殿物を取り除いた後0.45 μ mのフィルター処理を行った。
- [0091] ミニモジュール(1)の外側のポートのひとつをキャップし、他のひとつはシリコーンチューブをつなぎ、透過用ペリスターポンプに接続した。一方中空糸膜内側の液はモジュールの原液入口と原液出口をシリコーンチューブでつなぎ溶液循環回路となし、ペリスターポンプを用いて血清を循環できるようにした。また溶液循環回路の途中には追加のPBSを投入する入口を設けた。
- [0092] 4mlの血清を用いて循環流量5ml/min、濾過流量0.2ml/minの流速で20℃、4時間濾過を実施した(本工程は、主にアルブミンより大きいタンパク質を分画する工程に相当する)。この時濾過された容量分は、PBSを血清に添加して循環する液量は一定に保った。4時間で得た濾液すなわち生体成分の組成が変化した溶液52.5ml中のアルブミン濃度は61mg/l、 α 1-ミクログロブリン濃度は0.4mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.066mg/lであった。用いたヒト血清中の総タンパク質濃

度は53000mg/l、アルブミン濃度は33000mg/l、 α 1-ミクログロブリン濃度は16.5mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は1.17mg/lであり、アルブミン濃度の大幅低下が認められた。

[0093] 溶液の総タンパク質はMicro BCA Protein Assay (PIERCE社製)を用いて、検量線にはBSA用いて測定を行った。濾液中の総タンパク質濃度は275mg/lであり、総タンパク濃度に対するアルブミンの濃度は0.22であった。また、総タンパク質に対する β 2-ミクログロブリンの濃度はヒト血清中の0.0000223に対して濾液中では0.00024であり、10.8倍に増加していた。

[0094] (実施例2)

ポリスルホン(ソルバー社製ユーデル(登録商標)P-3500)18重量部およびポリビニルピロリドン(BASF社製K30)9重量部をN, N'-ジメチルアセトアミド72重量部および水1重量部の混合溶媒に加え、90℃で14時間加熱して溶解し、製膜原液を得た。この製膜原液を外径0.3mm、内径0.2mmのオリフィス型二重円筒型口金の外側の管より吐出した。芯液としてN, N'-ジメチルアセトアミド58重量部および水42重量部からなる溶液を内側の管より吐出した。吐出された製膜原液は、口金から凝固浴液面までの距離350mmを通過した後、水100%の凝固浴に導かれ、中空糸膜が得られた。得られた中空糸膜の構造を電子顕微鏡(日立社製S800)にて確認したところ非対称構造を有していた。得られた中空糸膜を10000本、一般の透析器と同様に透析液入口および透析液出口を有する円筒状のプラスチックケースに挿入し、両端部を樹脂で封止して、有効膜面積1.6m²の中空糸膜モジュールを作成した。カチオン性親水性高分子としてポリエチレンイミン(BASF社製、重量平均分子量100万)0.1重量%を含む水溶液を、この中空糸膜モジュールの中空糸膜内面側および外面側に充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。モジュールの γ 線吸収線量は27kGyであった。該モジュールの中空糸膜を切り出し、100本束ね、中空糸膜中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュールの外直径は約7mm、全体長さは約17cmであり、一般的な中空糸膜型透析器同様に中空糸の外側のポートを2個有している。中空糸膜およびモジュール内部を蒸留水にて洗浄した。そ

の後、PBS(日水製薬社製ダルベッコPBS(-))水溶液を充填し、ポリエチレンイミン固定化中空糸膜ミニモジュール(以降ミニモジュール(2)と略す)を得た。本ミニモジュールを2本作成し、うち1本を用い分離膜の透過比率を測定したところ400であった。残りのミニモジュールを以下の実験に用いた。

- [0095] ヒト血清(SIGMA社、H1388、Lot 28H8550)を3000rpm、15分の条件にて遠心処理を行い上澄み液および沈殿物を取り除いた後0.45 μ mのフィルター処理を行った。
- [0096] まず、実施例1と同じ中空糸膜ミニモジュール(ミニモジュール(1))を準備し、中空糸の外側のポートのひとつをキャップし、もうひとつはシリコンチューブをつないだ。中空糸膜内側の液については原液の入口と出口をシリコンチューブでつなぎ溶液循環回路とし、途中にはペリスターポンプを設けて原液を循環できるようにした。溶液循環回路の途中には三方バルブを設け、一方にはチューブを介して注入用ポンプを設けた。さらに、ミニモジュール(2)も外側ポートのひとつをキャップし、もうひとつはシリコンチューブを接続した。またこのミニモジュールも、中空糸膜内側の液については、原液の入口と出口をつなぎ溶液循環回路とし、途中にはペリスターポンプを設けて溶液が循環できるようにした。またこの溶液循環回路の途中に三方バルブを設けた。
- [0097] ミニモジュール(1)の外側のポートにつながれたシリコンチューブとミニモジュール(2)の溶液循環回路の途中に設けられた三方バルブとを接合した。そして、これらチューブおよび2つのモジュール内にPBSを充填し、図2に示すようなミニモジュールが2段直列につながったシステムを作成した。ここで、ミニモジュール(1)の使用がアルブミン以上の分子量であるタンパク質を分画する工程、ミニモジュール(2)の使用がアルブミン以上の分子量であるタンパク質を吸着する機能と、アルブミン以上の分子量であるタンパク質を分画する機能の両者を備える工程に相当する。
- [0098] 注入用ポンプを通じて、チューブを介して血清を投入し、ミニモジュール(1)およびミニモジュール(2)それぞれの溶液循環回路の循環流量5ml/min、濾過流量0.2 mlL/minの流速で20℃、4時間濾過を実施した。この時濾過された溶液の容量分のPBSを注入用ポンプを通じて加えて、循環する液量は一定に保った。

[0099] 4時間経過後、モジュール(2)から得た濾液すなわち生体成分の組成が変化した溶液中のアルブミン濃度は0.62mg/L、 α 1-ミクログロブリン濃度は0.036mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.05mg/Lであった。用いたヒト血清中の総タンパク質濃度は53000mg/l、アルブミン濃度は33000mg/l、 α 1-ミクログロブリン濃度は16.5mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は1.17mg/lであり、アルブミン濃度の大幅な低下を認めた。濾液中の総タンパク質濃度は8.1mg/lであり、総タンパク質濃度に対するアルブミン濃度の比率は0.08であった。また、総タンパク質に対する β 2-ミクログロブリンの濃度はヒト血清中の0.0000223に対して濾液中では0.00617であり、277倍に増加していた。

[0100] このサンプルを2次元電気泳動にて分析した結果を図7に示す。

[0101] 図7は実施例2で得られた、生体成分の組成が変化した溶液、3000ul分を用いて得た濃縮液の2次元電気泳動写真である。図7から判るように、分子量6万未満の場所に多くの独立したスポットが見られる。本デバイスによって分離したサンプルは低分子量領域に数多くのスポットを得ることが出来た。

(比較例1)

分離前ヒト血清を比較サンプルとして2次元電気泳動分析を行った。結果を図8に示す。図8は、実施例2で処理する前のヒト血清0.5ulを試料とした2次元電気泳動写真である。図8では、スポットがブロードであり、物質を特定することができないと共に、低分子量領域でのスポットはほとんど観察されない。

(実施例3)

東レ株式会社製透析器BS1.8L(Lot. 20440312)の両端の樹脂接着部分を切り、中空糸膜を得た。得られた中空糸膜の寸法は、内直径200 μ m膜厚40 μ mであり、中空糸膜の構造を電子顕微鏡(日立社製S800)にて確認したところ非対称構造を有していた。

[0102] 該中空糸膜を100本束ね、中空糸膜中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュールの内直径は約5mm、長さは約17cmであり、一般的な中空糸膜型透析器同様に中空糸膜の内側のポート(血液ポート)を2個と外側のポート(透析液ポ

ート)を2個有している。該ミニモジュールの中空糸膜およびモジュール内部を蒸留水にて洗浄した。その後、PBS(日水製薬社製ダルベッコPBS(-))水溶液を充填し、中空糸膜ミニモジュール(以降、ミニモジュール(3)と略す)を得た。本ミニモジュールを2本作成し、うち1本を用いて分離膜の透過比率を測定したところ149であった。残りの1本は以下の実験に用いた。

- [0103] ヒト血清(SIGMA社 H1388、Lot 122K0424)を3000rpm15分の条件にて遠心処理を行い沈殿物を取り除いた後0.45 μ mのフィルター処理を行った。
- [0104] 図1に示すようにミニモジュール(1)の外側のポートのうち、モジュールの下部ポート106をキャップし、上部ポートは膜分離ユニットの処理液回収口104とした。中空糸膜内側の液は原液入口と出口をシリコンチューブでつなぎ溶液循環回路102とし、途中にはペリスターポンプである循環用ポンプ103を設けて血清を循環できるようにした。また溶液循環回路102の途中には三方バルブ101を設け、三方バルブ101から一方には注入用ポンプを装着した。
- [0105] 4mlの血清を、注入用ポンプを介して1.0ml/minで加えた後、循環流量10ml/min、濾過流量1.0mL/minの流速で20℃、50分間濾過を実施した。この時、透過により濾過された容量に相当する容量である1.0ml/minの流速PBSを循環回路に加えて、循環する液量を一定に保った。50分間で得られた溶液は、約50mlでアルブミン濃度は32.8mg/l、 α 1-ミクログロブリン濃度は0.06mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.068mg/Lであり、原液として用いたヒト血清中の総タンパク質濃度は48000mg/l、アルブミン濃度は29800mg/L、 α 1-ミクログロブリン濃度は13.2mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は1.27mg/Lであった。原液として用いたヒト血清は、総タンパク質量は192000 μ g、アルブミン量119000 μ g、 α 1-ミクログロブリン52.8 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は5.08 μ gであったのに対して、濾液の総タンパク質量は56000 μ g、アルブミン量1640 μ g、 α 1-ミクログロブリン3.00 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は3.40 μ gであり、 β 2-ミクログロブリン量を維持しながら、アルブミンを大幅に除去することができた。これらの結果より、総タンパク質濃度に対するアルブミンの組成比率は0.15であった。また、総タンパク質に対する β 2-ミクログロブリンの組成比率はヒト血清中の0.0000265に対して濾液中では0

. 00613であり、23倍に増加していた。

(実施例4、比較例2)

実施例3で得られた中空糸膜(透過比率149)を用いて、ミニモジュールを1個作成した。ミニモジュールの形状、中空糸膜本数は実施例3と同様である。このミニモジュールを以下ミニモジュール(4)という。また、実施例3で得られた中空糸膜(透過比率149)40本を、内直径が約5mm、長さが約12cmのガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュール(以降、ミニモジュール(5)と略す)を実施例1と同様に2個作成した。これらミニモジュールを以下の実験に用いた。

- [0106] ヒト血清(SIGMA社、H1388、Lot 122K0424)を3000rpm、15分の条件にて遠心処理を行い濾液および沈殿物を取り除いた後0.45 μ mのフィルター処理を行った。
- [0107] まず、1個のミニモジュール(4)を準備し、外側のポートのうちひとつをキャップし、もうひとつはシリコンチューブをつないだ。中空糸膜内側の液については、原液入口と出口とをシリコンチューブでつなぎ溶液循環回路とし、当該回路にペリスターポンプを設け、溶液を循環できるようにした。前記溶液循環回路の途中に三方バルブを設け、三方バルブの一方向には注入ポンプを取り付けた。これを1段目の膜分離ユニットとした。さらに、ミニモジュール(5)のうち1個のミニモジュールについて、外側のポートのうちひとつをキャップし、ほかのひとつはシリコンチューブを接続した。ミニモジュール(5)の中空糸膜内側の液についても、モジュールの原液入口と出口をシリコンチューブでつなぎ溶液循環回路とし、当該回路にペリスターポンプを設けて溶液を循環できるようにした。さらに前記溶液循環回路の途中に三方バルブを設けた。これを2段目の膜分離ユニットとした。さらに、もう1個のミニモジュール(5)の外側のポートのうちひとつをキャップし、のこりの一つはシリコンチューブを接続した。2個目のミニモジュール(5)の中空糸膜内側の液についても、モジュールの原液入口と出口をシリコンチューブでつなぎ、溶液循環回路となし、回路の途中にペリスターポンプを設けて溶液を循環できるようにした。さらに前記溶液循環回路の途中に三方バルブを設けた。これを3段目の膜分離ユニットとした。次に各ミニモジュールの外側のポートに接続されたシリコンチューブを次の段の膜分離ユニットの三方バルブ

につなぎ、分離システム全体にPBSを充填し、図3に示すような3段の膜分離ユニットを有する分離システムを作成した。

[0108] 図3は、この実施例で用いた分離システムの概略図である。液の流れを矢印で示してある。血清および希釈液(PBS)が注入ポンプ100から、三方バルブ101を経て溶液循環回路102の中に入り、さらに循環循環用ポンプ103によって送液され、第1の分離膜モジュール105(ミニモジュール(4))に注入され、そして溶液循環回路102を循環する。第1の膜分離ユニットで得られた溶液は、膜分離ユニットの処理液回収口104から取り出される。次に、この溶液は、2段目の分離膜ユニットに流入し、2段目の分離膜モジュール205(第1のミニモジュール(5))に注入され、さらに2段目溶液循環回路202を、2段目循環用ポンプ203により循環する。第2の膜分離ユニットの2段目の分離膜モジュール205にて透過した溶液は、処理液回収口204から取り出される。さらに、この溶液は、第3の分離膜ユニットに流入し、第3の分離膜モジュール305(第2のミニモジュール(5))に注入され、循環する。の第3の分離膜モジュールを透過した溶液は、処理液回収口304から得られる。

[0109] 詳細な条件は以下のとおりである。4mlの血清を0.2ml/minで1段目の膜分離ユニットに加えた後、1段目の膜分離ユニット、2段目の膜分離ユニット、3段目の膜分離ユニット共に流量5.0mL/minの条件で溶液循環回路を循環させ、また各分離膜モジュール濾過流量を0.2mL/minとする流速で20℃、4時間濾過を実施した。この時、透過により濾過された容量分のPBSを0.2ml/minで注入ポンプ100を経て第1の膜分離ユニットに加えて、循環する液量を一定に保った。4時間で得られた溶液は、約47mlであった。この溶液をザルトリウス社製膜vivaspin20(3000MWCOタイプ)を用いて4mlに濃縮したところ、アルブミン濃度は0.38mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.583mg/Lであり、原液として用いたヒト血清中の総タンパク質濃度は49000mg/l、アルブミン濃度は31200mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は1.19mg/Lであった。原液として用いたヒト血清の総タンパク質濃度は196000 μ gであり、アルブミン量124800 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は4.76 μ gであったのに対して、濾液の総タンパク質量は100 μ g、アルブミン量1.5 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は2.3 μ gであり、 β 2-ミクログロブリン量を維持しながら、アルブミンを大

幅に除去することができた。これらの結果より、総タンパク質濃度に対するアルブミンの組成比率は0.02であった。また、総タンパク質に対する β 2-ミクログロブリンの濃度はヒト血清中の0.0000243に対して濾液中では0.0307であり、1263倍に増加していた。

[0110] 該サンプルをザルトリウス社製vivaspın500(3000MWCOタイプ)を用いてサンプル容量が1/10になるまで濃縮し、サンプルバッファー(0.5Mトリス塩酸(pH6.8) 0.5ml、グリセロール0.4ml、10%SDS0.8ml、0.1%プロモフェノールブルー0.1ml、これらに蒸留水を加えて10mlとしたもの)を等量加え、沸騰水中で3分間加熱した溶液のうち25 μ lを電気泳動にて分析した。結果を図6のS3レーンに示す。市販の分子量マーカーであるRainbow マーカー(Amersham Biosciences、RPN 756)をS1レーンに、また、比較のために実施例4の分離システム処理前のヒト血清(0.02 μ l相当)にサンプルバッファーを加え、沸騰水中で3分間加熱した溶液をS2レーンにアプライし、S1からS3レーンのサンプルを同時に泳動した結果を併せて図6に示す。

[0111] S2レーンから判るように、ヒト血清は、分子量6万以上の場所にタンパク質が多く存在し、分子量1.5万以下の場所にタンパク質は少量しか観察されなかった。それに対し、S3レーンから判るように、分離システムで処理した実施例4の濾液の濃縮液は、分子量6万以上の場所にタンパク質は少なく、分子量1.5万以下の場所に多くのタンパク質があることが確認できた。

[0112] (実施例5)

実施例1で作成した中空糸膜を γ 線を照射する前にモジュールから切り出し、100本準備した。50℃、相対湿度13%の雰囲気下で24時間乾燥させた。この中空糸膜を実施例4と同様にエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュールの中空糸膜およびモジュール内部を蒸留水にて洗浄した。その後、PBS(日水製薬社製ダルベッコPBS(-))水溶液を充填し、濃縮用中空糸膜ミニモジュール(以降、ミニモジュール(6)という)を得た。

[0113] さらに、ミニモジュール(6)の外側のポートのうちひとつをキャップし、一方は濾液

出口とした。このミニモジュール(6)の中空糸膜内側の液も、モジュールの原液入口と出口をシリコンチューブでつなぎ溶液循環回路となし、ペリスターポンプを用いて原液を循環できるようにした。また溶液循環回路の途中には三方バルブを設けた。またこれを濃縮膜ユニットとした。

[0114] 実施例4で用いた3段の膜分離ユニットを有する分離システムを新たに作成した。3段目のミニモジュールの処理液回収口と濃縮膜ユニットの三方バルブとをシリコンチューブで接合した。また濃縮膜ユニットの溶液循環回路の途中には、三方バルブからなる濃縮ユニットの処理液回収口が設けられており、濃縮の操作中は溶液循環回路のみが開通するようにしている。システム全体にPBSを充填し、アルブミン以上のタンパク質を分子ふるいにより分画する膜分離ユニットとタンパク質を濃縮するユニットが直結された複合システムを作成した。

[0115] 図4は、この実施例5で用いた分離システムの概略図(膜分離ユニットと濃縮ユニットの例)である。液の流れを矢印で示してある。血清および希釈液(PBS)が注入ポンプ100、三方バルブ101を経て、溶液循環回路102の中に注入されさらに循環用ポンプ103によって送液せられ、第1の分離膜モジュール105(ミニモジュール(4))に注入され、溶液循環回路102を循環する。第1の膜分離ユニットで処理された溶液は、膜分離膜ユニットの処理液回収口104から得られる。次に、この溶液は、第2分離膜モジュール205(第1のミニモジュール(5))に注入され、2段目循環回路202循環する。第2の膜分離ユニットで処理された溶液は、処理液回収口2段目の膜分離ユニットの処理液回収口204から得られる。さらに、この溶液は、第3の分離膜モジュール305(第2のミニモジュール(5))に注入され、3段目溶液循環回路302を循環する。第3の膜分離ユニットで処理された液は、処理液回収口304から得られる。さらに、この処理液は、濃縮膜モジュール405(ミニモジュール(6))に注入され、濃縮ユニット循環回路402を循環する。その際、濃縮膜モジュールから透過した液は濃縮ユニットの濾液出口404から取り出され、廃棄される。透過、濃縮の操作終了後、濃縮膜モジュールの循環回路402に残っている溶液は濃縮ユニットの処理液回収口407を開放することにより取り出される。

[0116] 具体的条件は以下のとおりである。1mlの血清を0.2ml/minで1段目の膜分離

ユニットに加えた後、1段目の膜分離ユニット、2段目の膜分離ユニット、3段目の膜分離ユニット共に流量5.0mL/minの条件で各溶液循環回路を循環し、各モジュールの濾過流量0.2mL/minの流速で20℃、4時間濾過を実施した。この時、濾過された容量分のPBSを0.2ml/minで注入ポンプ100から加えて、各分離ユニットおよび濃縮ユニットを循環する液量を一定に保った。

- [0117] 4時間の運転後にバルブ407から取り出した溶液のアルブミン濃度は、0.490mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.502mg/Lであり、原液として用いたヒト血清中の総タンパク質濃度は49000mg/l、アルブミン濃度は31200mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は1.19mg/Lであった。原液として用いたヒト血清の総タンパク質量は196000 μ g、アルブミン量124800 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は4.76 μ gであったのに対して、濾液は3.7mlで、アルブミン量1.81 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は1.86 μ gであり、 β 2-ミクログロブリン量を維持しながら、アルブミンを大幅に除去することができた。これらの結果より、総タンパク質濃度に対するアルブミンの組成比率は0.0297であった。また、総タンパク質に対する β 2-ミクログロブリンの濃度はヒト血清中の0.0000243に対して濾液中では0.0304であり、1253倍に増加していた。

(比較例3)

市販の平膜を用いた分離システム(ポリエーテルスルホン膜使用)を用い、3000rpm、の条件下で、PBSで4倍に希釈した血清4.7mlの濾過を行った。

- [0118] アルブミン濃度は5755mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.534mg/lであり、原液として用いたヒト血清中のアルブミン濃度は128.5mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.446mg/lであった。原液として用いたヒト血清は、アルブミン量27049 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は2.51 μ gであったのに対して、濾液はアルブミン量578 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は2.01 μ gであった。 β 2-ミクログロブリンとアルブミンと透過比率(ここでは濾液の濃度を原液の濃度で除した値を透過率とし、 β 2-ミクログロブリンの透過率をアルブミンの透過率で除した値を透過比率とした)は40と低かった。アルブミンの濃度組成比も0.32と高かった。

(実施例6)

実施例5のミニモジュール(6)に内蔵する中空糸膜に置き換えて、実施例2のミニモジュール(2)で用いた中空糸膜を用いた以外は実施例5と同様の複合システムを作成した。

- [0119] 実施例5と同様に1mlの血清を処理し、4時間に処理回収口407から取り出した液のアルブミン濃度は0.3mg/l、 β 2-ミクログロブリン濃度は0.515mg/Lであり、原液として用いたヒト血清中の総タンパク質濃度は49000mg/l、アルブミン濃度は31200mg/L、 β 2-ミクログロブリン濃度は1.19mg/Lであった。原液として用いたヒト血清の総タンパク質量は196000 μ g、アルブミン量124800 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は4.76 μ gであったのに対して、濾液は3.8mlで、アルブミン量1.141 μ g、 β 2-ミクログロブリン量は2.0 μ gであり、 β 2-ミクログロブリン量を維持しながら、アルブミンを大幅に除去することができた。これらの結果より、総タンパク質濃度に対するアルブミンの組成比率は0.02であった。また、総タンパク質に対する β 2-ミクログロブリンの濃度はヒト血清中の0.0000243に対して濾液中では0.0343であり、1414倍に増加していた。

産業上の利用可能性

- [0120] 本発明の方法または調整装置によれば、分析精度が向上した生体成分を含有する溶液を得ることができ、この溶液は医薬研究および臨床現場におけるプロテオーム解析の試料として好適である。

請求の範囲

- [1] 生体成分含有溶液を、少なくとも β 2-ミクログロブリンとアルブミンの透過比率が50以上である分離膜に供給し、分離膜により透過させることを特徴とする、総タンパク質に対するアルブミンの濃度組成比が0.3未満である生体成分の組成が変化した溶液の調製方法。
- [2] 前記分離膜の透過比率が70以上であることを特徴とする請求項1記載の溶液の調製方法。
- [3] 前記濃度組成比が0.1未満であることを特徴とする請求項1記載の溶液の調製方法。
- [4] 生体成分含有溶液の総タンパク質中の β 2-ミクログロブリンの組成比率に対する、生体成分の組成が変化した溶液の総タンパク質中の β 2-ミクログロブリンの組成比率が、10倍以上であることを特徴とする請求項1の溶液の調製方法。
- [5] 前記倍率が100倍以上であることを特徴とする請求項4の溶液の調製方法。
- [6] 分離膜の膜内の流路が非対称構造である請求項1の溶液の調製方法。
- [7] 生体成分が血液、血漿、血清などの血液由来物、尿、腹水、唾液、涙液、脳脊髄液、胸水もしくは細胞からタンパク質を抽出した溶液であることを特徴とする請求項1の溶液の調製方法。
- [8] 請求項1〜7いずれかの調整方法によって得られたプロテオーム解析用溶液。
- [9] 請求項1〜7いずれかの方法によって生体成分の組成が変化した溶液を調製した後、前記溶液に含まれるタンパク質を分析することを特徴とする、生体成分に含まれるタンパク質の分析方法。
- [10] タンパク質の分析手段が質量分析、電気泳動分析および液体クロマトグラフィーから選ばれる少なくとも1種である請求項9記載のタンパク質の分析方法。
- [11] β 2-ミクログロブリンとアルブミンの透過比率が50以上である分離膜を内蔵するモジュールを有する装置であって、モジュールが分離膜の原液側に生体成分含有溶液の原液入口、および分離膜により透過した透過液の出口を少なくとも有することを特徴とする、生体成分の組成が変化したプロテオーム解析用の溶液を調製する装置。
- [12] 分離膜を内蔵し、前記分離膜の原液側流路に連結された原液入口および原液出口

、ならびに分離膜の透過液の出口を有するモジュール、
前記原液入口と前記原液出口とを連結し、途中にポンプおよび分離用対象液入口
を有する溶液循環回路、ならびに
前記分離用対象液入口の上流の位置に、または前記溶液循環回路の途中の位置
に、設けられた希釈液流入口、
を具備することを特徴とする生体成分の組成が変化した溶液を調製するための液流
回路。

- [13] 請求項12の液流回路を少なくとも2個含み、1の液流回路の分離対象液出口と他の
1の液流回路の分離対象液入口が液流路で直接または間接に連結されていることを
特徴とする生体成分の組成が変化した溶液を調製するための装置。
- [14] 分離膜を内蔵するモジュールを用い、分離膜の原液側に生体成分含有溶液を流入
させ、原液側の液をモジュールの外に設けられた溶液循環回路を通じて循環させ、
分離膜を透過した液を生体成分の組成が変化した溶液として取り出す工程であって
、生体成分含有溶液の流入開始後、生体成分含有溶液への希釈液を、モジュール
に内蔵した分離膜の原液側に追加流入させることを特徴とする、生体成分の組成が
変化した溶液の調製方法。
- [15] 分離膜の原液側に流入する生体成分含有溶液の流量 Q_1 、透過した液の流量 Q_2 が
、 $0 < Q_2 / Q_1 < 1$ を満たす条件で分離されることを特徴とする請求項14に記載の
溶液の調製方法。
- [16] Q_2 / Q_1 が、 $0.005 \leq Q_2 / Q_1 \leq 0.5$ である請求項15に記載の溶液の調製方法。
- [17] 透過した液の流量 Q_2 と分離膜の原液側に流入する生体成分含有溶液および希釈
液の流量の和 Q_3 が $0.5 \leq Q_2 / Q_3 \leq 1.5$ を満たすものである請求項14に記載の
溶液の調整方法。
- [18] Q_2 / Q_3 がおよそ1である請求項17に記載の溶液の調製方法。
- [19] 希釈液に、生理食塩水または緩衝溶液を用いることを特徴とする請求項14記載の溶
液の調整方法。
- [20] 生体成分が血液、血清などの血液由来物、尿、腹水、唾液、涙液、脳脊髄液、胸水
もしくは細胞からタンパク質を抽出した溶液であることを特徴とする請求項14溶液の

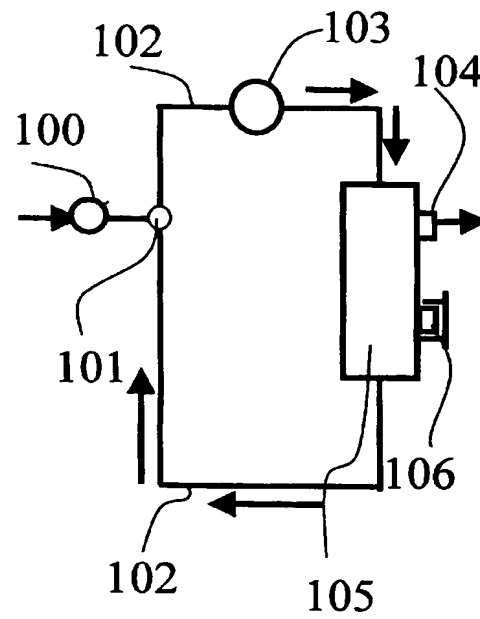
調製方法。

- [21] 2個のモジュールを用い、第1のモジュールで請求項14の調製方法で得られた溶液を用い、さらに第2のモジュールで請求項14の調製方法を行うことを特徴とする生体成分の組成が変化した溶液の調製方法。
- [22] 生体成分含有溶液を少なくとも2工程の処理を行うことによって、生体成分含有溶液から生体成分の組成が変化した溶液を調製する方法であって、前記工程が
(1)分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を吸着する工程、
(2)分子量がアルブミン以上のタンパク質を分子篩いにより分画し、一部または全部を除去する工程および
(3)タンパク質を濃縮する工程
から選ばれる少なくとも2工程を連結して用いることを特徴する生体成分から組成が変化した溶液を調製する方法。
- [23] 前記(1)の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリエチレンおよびポリプロピレン、からなる群より1種類以上選択される素材を含む材料を用いることを特徴とする請求項22に記載溶液の調製方法。
- [24] 前記(2)の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリエチレンおよびポリプロピレンからなる群より1種類以上選択される素材を含む分離膜を用いることを特徴とする請求項22に記載の溶液の調製方法。
- [25] 前記(3)の工程に、セルロース、セルロースアセテート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメタクリル酸エステル、ポリアクリル酸エステル、ポリアミド、ポリ弗化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンおよびポリプロピレンからなる群より1種類以上選択される素材を含む分離膜を用いることを特徴とする請求項22に記載の溶液の調製方法。
- [26] ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、ポリフェノール、ブルー色素、2価金属イオ

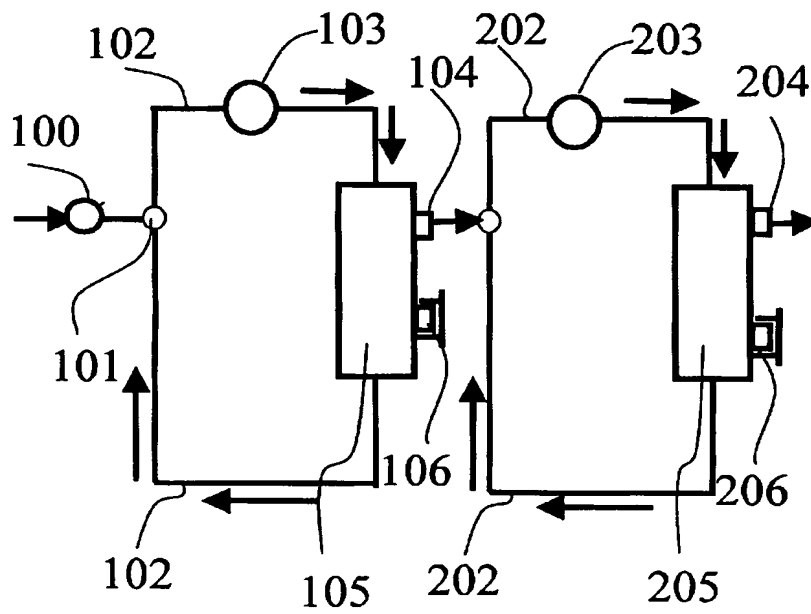
ンおよびアルキル基含有化合物からなる群より1種類以上選択される物質が表面に固定された素材を(1)の工程または(2)の工程に用いる請求項22に記載溶液の調製方法。

- [27] 界面活性剤、乳化剤、有機溶媒、アルコール、エチレングルコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレンイミン、アミノメチルピリジン、硫酸プロタミン、硫酸アンモニウム、ポリフェノール、ブルー色素、カオトロピック塩およびアルキル基含有化合物からなる群より1種類以上選択される物質を(1)の工程または(2)の工程における水溶液に添加することを特徴とする請求項22記載の溶液の調製方法。
- [28] 生体成分含有溶液がヒト由来成分の検体を含むことを特徴とする請求項22溶液の調製方法。
- [29] (1)分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を吸着する手段、(2)分子量がアルブミン以上のタンパク質の一部または全部を分子篩いにより分画する手段および(3)タンパク質を濃縮する手段から選ばれる少なくとも2種の手段を有し、前記選ばれた手段同士が流路によって連結されていることを特徴とする生体成分含有溶液から組成が変化した溶液を調製する装置。
- [30] 液体クロマトグラフ、電気泳動装置または質量分析装置に連結できる液流出路を有する請求項29の溶液を調製する装置。

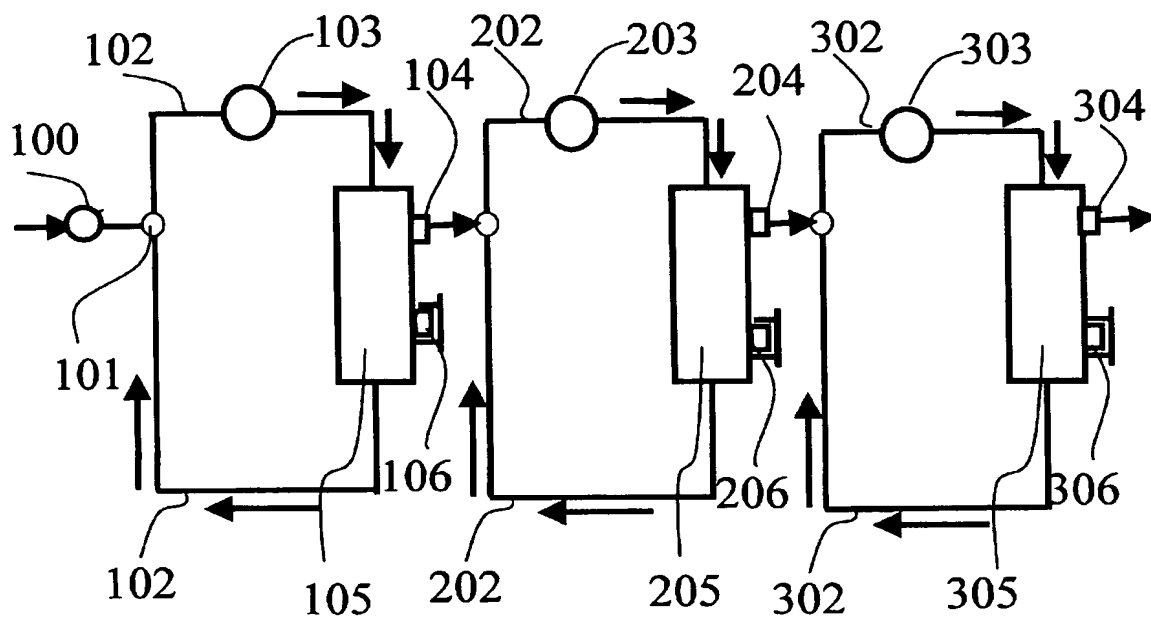
[図1]



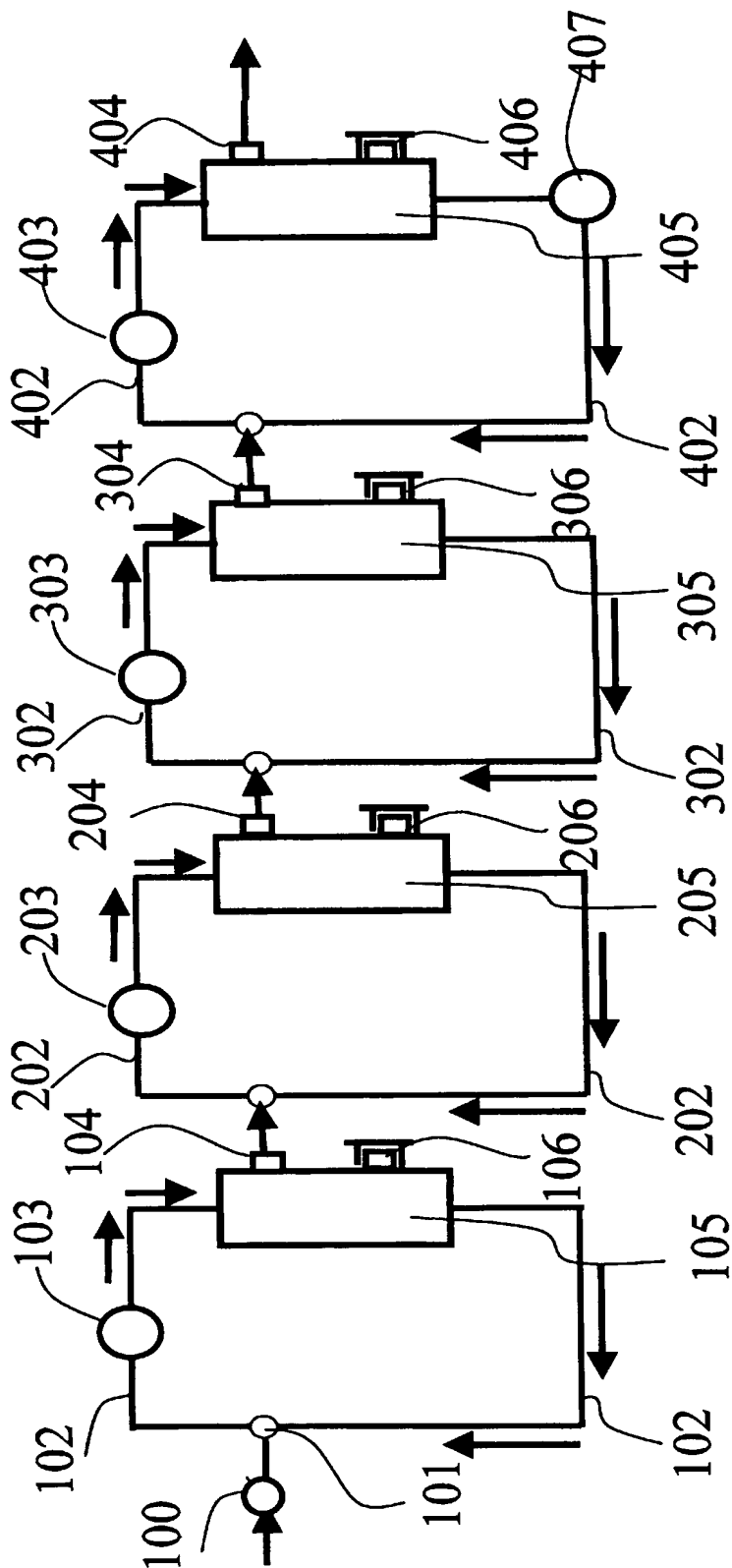
[図2]



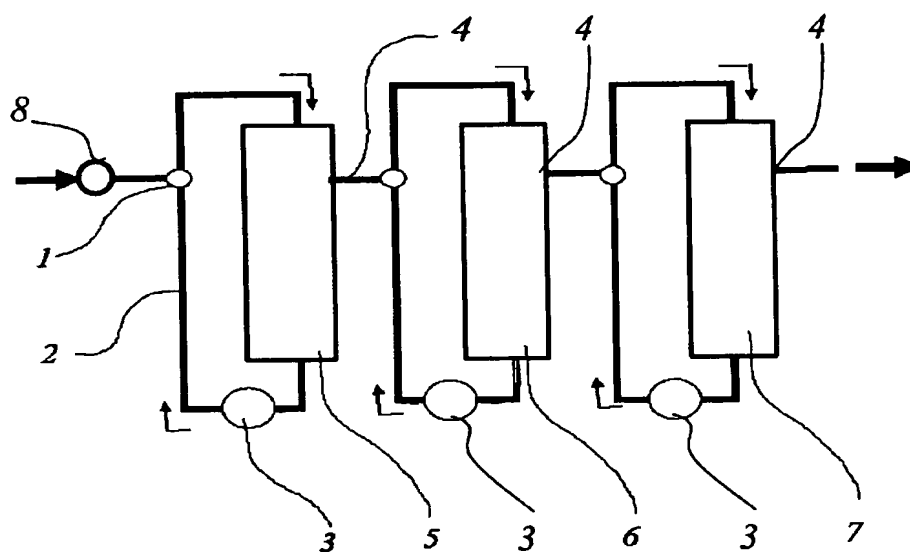
[図3]



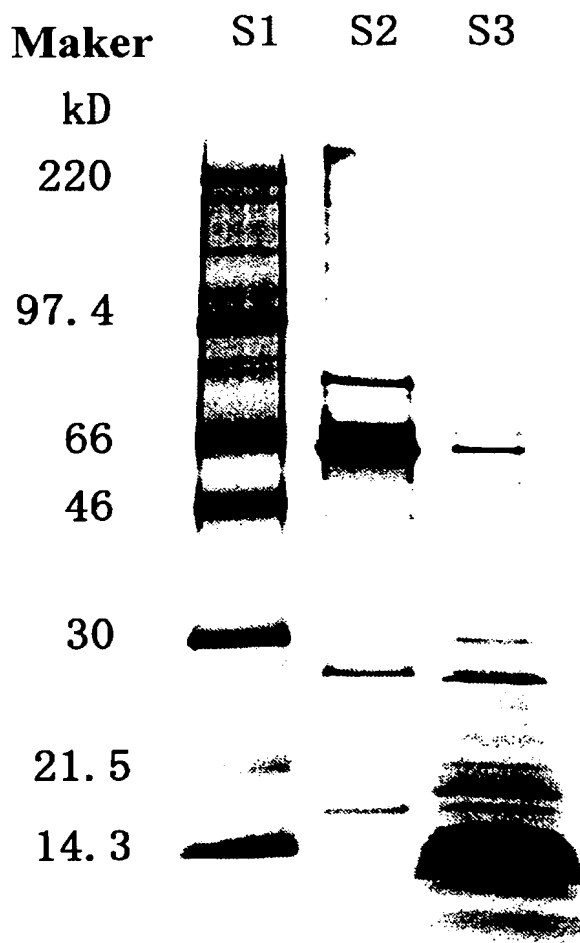
[図4]



[図5]

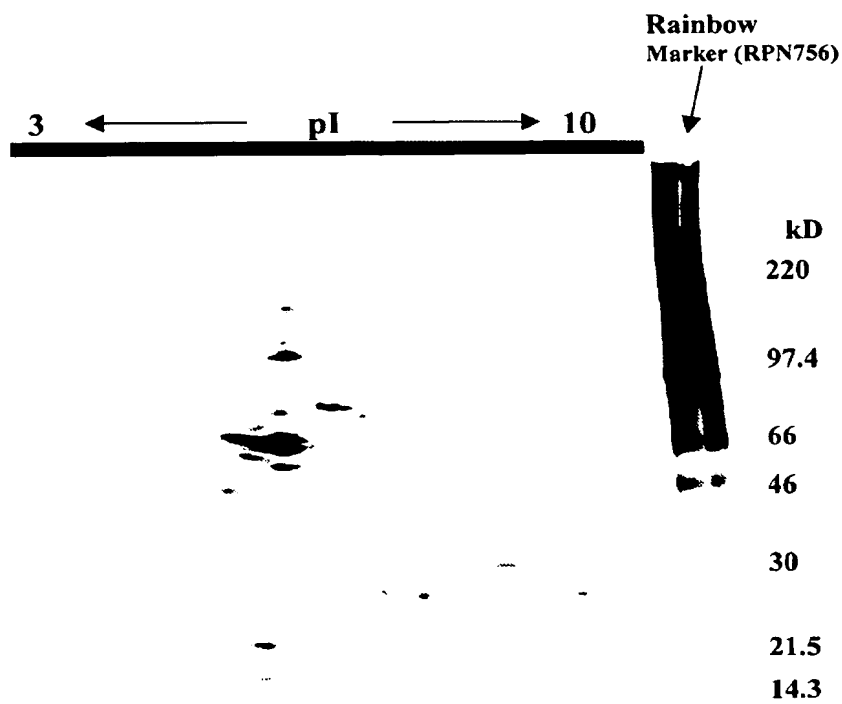


[図6]

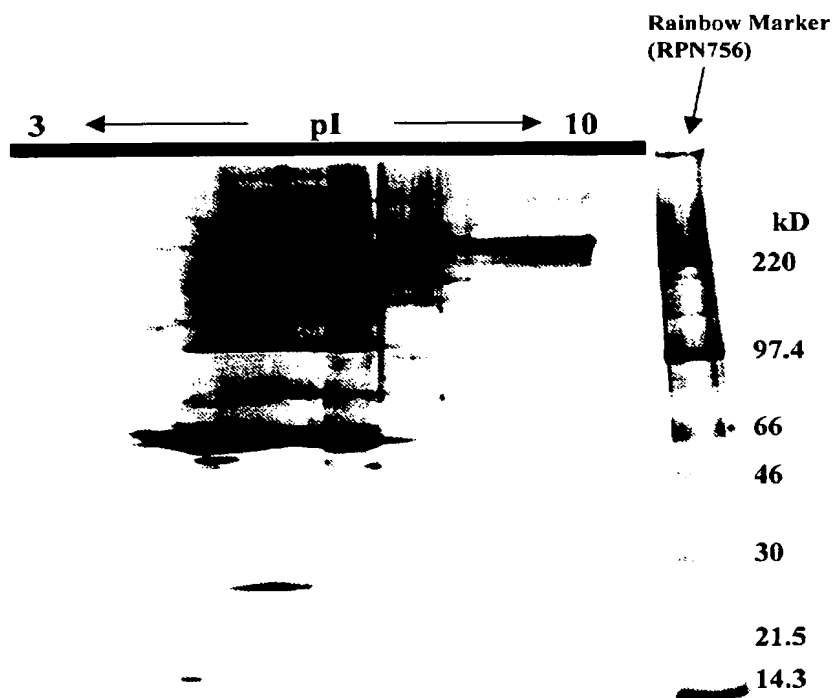


NOT AVAILABLE COPY

[図7]



[図8]



AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K1/14, C12P1/00, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K1/00-19/00, C12P1/00-41/00, C12M1/00-3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | WO 01/072844 A2 (Amersham Biosciences Aktiebolag), 04 October, 2001 (04.10.01), & JP 2003-530326 A & EP 1268551 A2 & US 2003/0143222 A1 & US 6835379 B2 | 22-30 |
| Y | JP 01-230370 A (Kaneka Corp.), 13 September, 1989 (13.09.89), (Family: none) | 12-21 |
| Y | JP 01-22259 A (Ube Industries, Ltd.), 25 January, 1989 (25.01.89), & US 4904234 A | 12-21 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 December, 2004 (21.12.04)

Date of mailing of the international search report
08 February, 2005 (08.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012923

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Ahmed N, et al., "An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum.", PROTEOMICS, Vol.3, No.10, (on-line Ban: 23.06.2003), pages 1980 to 1987 | 1-11 |
| A | Deborah L. Rothmund et al., "Depletion of the highly abundant protein albumin from human plasma using the GradiFlow.", PROTEOMICS, Vol.3, No.3, (March 2003), pages 279 to 287 | 1-11 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K 1/14, C12P 1/00, C12M 1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K 1/00 ~ 19/00, C12P 1/00 ~ 41/00, C12M 1/00 ~ 3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | WO 01/072844 A2 (Amersham Biosciences Aktiebolag) 2001.10.04 & JP 2003-530326 A & EP 1268551 A2 & US 2003/0143222 A1 & US 6835379 B2 | 22-30 |
| Y | JP 01-230370 A (鐘淵化学工業株式会社) 1989.09.13 (ファミリー無し) | 12-21 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 12. 2004

国際調査報告の発送日

08. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

PCT ADVISORY COPY

| C (続き) .. 関連すると認められる文献 | | |
|------------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | JP 01-22259 A (宇部興産株式会社) 1989.01.25 & US 4904234 A | 12-21 |
| A | Ahmed N, et al., "An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum." PROTEOMICS, Vol.3, No.10, (on-line 版:23. 06.2003), p.1980-1987. | 1-11 |
| A | Deborah L. Rothmund, et al., " Depletion of the highly abundant protein albumin from human plasma using the Gradiflow." PROTEOMICS, Vol.3, No.3, (March 2003), p.279-287 | 1-11 |